amsterdam 1920

OVER VARIABILITEIT IN DE ZOOGENAAMDE TYPHUS-COLIGROEP

F. H. TER POORTEN

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/overvariabilitei0000unse

OVER VARIABILITEIT IN DE ZOO-GENAAMDE TYPHUS-COLIGROEP

OVER VARIABILITEIT IN DE ZOOGENAAMDE TYPHUS-COLIGROEP

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS JHR. DR. J. SIX, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP DONDERDAG 24 JUNI 1920, DES NAMIDDAGS TE 4 URE IN DE AULA DER UNIVERSITEIT DOOR FRANCISCUS HENDRICUS TER POORTEN, OFFICIER VAN GEZONDHEID DER 1E KLASSE K. M., GEBOREN TE PONTIANAK.

C. DE BOER JR. — HELDER

AAN MIJN VROUW
AAN MIJN DOCHTER

Bij de voltooiing van dit proefschrift is het mij een voorrecht, U, Hooggeleerde SALTET en DE VRIES, mijn hartelijken dank te kunnen betuigen voor het vele, dat Gij voor mij zijt geweest. Met waardeering gedenk ik den tijd, dien ik op Uwe laboratoria werkzaam ben geweest en de hulp, die Gij mij ook daarna steeds hebt betoond.

Inzonderheid geldt mijn dank U, Hooggeleerde VAN LOGHEM, geachte promotor, voor Uw welwillenden steun en de belangstelling, die Gij steeds in mijn werk hadt. Niet licht zal ik de gastvrijheid vergeten, die ik in het Instituut voor Tropische Hygiëne mocht genieten: veel heb ik daar mogen leeren.

Zeer erkentelijk, Hooggeleerde KUENEN en Zeergeleerde SWELLENGREBEL, ben ik voor Uw onderwijs.

Ik mag ook niet nalaten U, mijn hooggeachten Chef, BRYAN, dank te zeggen voor de vrijheid, die Gij mij tot dezen arbeid hebt gelaten.

Ten slotte aan allen, die mij bij het bewerken van dit proefschrift op eenigerlei wijze van dienst zijn geweest, mijn hartelijken dank!

INHOUD.

		Blz.
I.	Inleiding	1
II.	Veranderlijkheid van B. coli	14
III.	Wijzigingsvatbaarheid van B. coli	24
IV.	Veranderlijkheid en wijzigingsvatbaarheid van B. typhosus en B. paratyphosus	44
V.	Samenvatting	59
	Litteratuur	64
	Stellingen	

I. INLEIDING.

Sinds LAMARCK, en later DARWIN den grooten stoot toebrachten aan het tot dusver algemeen heerschende dogma van de onveranderlijkheid der soorten van levende wezens op aarde, en in het menschelijk denken het evolutiebegrip onmisbaar bleek tot de vorming van eene voorstelling omtrent het ontstaan der oneindig vele planten- en dierenspecies, die onze planeet bevolken en bevolkt hebben, sindsdien heeft de veranderlijkheid van al wat leeft, hoe lang reeds waargenomen, een overwegenden invloed gekregen op den gedachtengang der natuurvorschers.

Zonder variabiliteit geen evolutie; dit toch is het axioma, dat allen onderzoekers tot leiddraad dient bij hunne beschouwingen en bij hunne experimenten.

Hoe variabiliteit tot evolutie leidt, daarover heeft het aan wisseling van inzichten niet ontbroken. Ik herinner slechts aan LAMARCK, die de erfelijkheid van verworven eigenschappen een overwegenden rol toekende; aan DARWIN, die de selectie in den strijd om het bestaan als het fundament der evolutie beschouwde; aan HUGO DE VRIES, die het mutatiebegrip ingang deed vinden.

Het ligt buiten mijn bestek, dieper op deze vraagstukken in te gaan; slechts wil ik, ter toelichting van de bestaande meeningsverschillen, de jongste uitingen van twee gezaghebbende biologen vermelden.

JOHANNSEN[20] komt tot de slotsom, dat mutatie de eenige manier is, waarop nieuwe biotypen (= soorten) kunnen ontstaan, afgezien van nieuwe combinaties na kruisingen, terwijl

LOTSY[38] van meening is, dat er slechts één wijze van soortvorming is, n.l. door kruising.

Dit brengt mij in medias res. Want na het bovenstaande is de eerste vraag, die bij ons oprijst: hoe staat de zaak bij de bacteriën? Naar algemeen wordt aangenomen, planten deze zich op ongeslachtelijke wijze voort. Al wordt dit wel eens betwijfeld, o. a. onlangs door SCHMITZ[54], zoolang hieromtrent niets is waargenomen, doen wij beter, ons in onze beschouwingen te beperken tot het aannemen van eene uitsluitend vegetatieve voortplantingswijze.

Kruising komt dus voor bacteriën niet in aanmerking, terwijl mutatie, welk begrip is opgesteld naar verschijnselen, waargenomen bij sexueel zich voortplantende organismen, ook niet zonder meer toepasselijk is op hetgeen zich bij de bacteriën voordoet.

Vele bacteriologen verlangen dus bij hun arbeid iets anders tot leiddraad, en als zoodanig kan de door LAMARCK op den voorgrond gebrachte *erfelijkheid* van gedurende het leven op de een of andere wijze *verworven eigenschappen* dienen.

Bij bacteriën is de in de beschouwingen van WEISMANN zoo belangrijke scheiding tusschen soma en kiemplasma moeilijker aan te nemen dan bij hoogere levende wezens: voor zoover de waarneming reikt, is de substantie van het bacterielichaam, dat zich bij de voortplanting over de twee dochterwezens verdeelt, gelijk van samenstelling; indien soma en kiemplasma aanwezig zijn, moeten beide zóó dooreengeweven zijn, dat deeling van het kiemplasma niet kan plaats hebben, zonder het soma daarbij mee te sleepen. Het is dus verklaarbaar dat vele bacteriologen de erfelijkheid van verworven eigenschappen verantwoordelijk stellen voor de evolutieprocessen.

Het is zeer te betreuren, dat de studie der variabiliteitsvraagstukken bij hoogere en lagere organismen zoo weinig als een meer samenhangend geheel wordt opgevat.

De oorzaak hiervan is waarschijnlijk gelegen in het feit,

dat thans nog zoovele vragen op een antwoord wachten en het studiegebied nog niet overzien kan worden. Maar het blijft teleurstellend voor den microbioloog, wanneer hij de litteratuur over deze onderwerpen nagaat, te moeten ervaren, dat variabiliteits-onderzoekers als JOHANNSEN zich tot enkele woorden over de bacteriën beperken, soms alleen tot de bloote vermelding: „dat het bij bacteriën zoo geheel anders is dan bij hoogere organismen."

En toch zijn er vingerwijzingen, die duiden op de wenschelijkheid, de studie der variabiliteitsleer bij bacteriën en hoogere organismen met elkaar in samenhang ter hand te nemen; ik herinner b.v. aan de meening van ROUX, dat bij de sexueel zich voortplantende organismen ook kiemplasma in de somacellen voorkomt, en aan die van SWELLENGREBEL, dat bij bacteriën niet het geheele soma aan de deeling meedoet[55].

De studie der variabiliteitsverschijnselen bij bacteriën levert voor den bioloog eigenaardige voordeelen op; door het ontbreken der amphimixis vallen allerlei moeilijkheden, die zich bij de beoordeeling van verschijnselen bij hoogere dieren en planten voordoen, weg. De vraagstelling wordt eenvoudiger, het antwoord beter te geven.

In het bovenstaande is de variabiliteit alleen besproken in haar samenhang met erfelijkheids- en evolutieproblemen. Ontegenzeggelijk is dit de belangrijkste zijde van het vraagstuk, maar er zijn nog andere, waarop ik straks terugkom. Eerst dien ik mij, tot een goed begrip van het volgende, even in te laten met eenige begrippen en namen, die wij telkens zullen ontmoeten.

De waarneming heeft geleerd, dat de soort, de species, veranderlijk is, doch dat de standvastigheid overweegt: zonder dit zou het begrip *soort* niet bestaanbaar zijn. Trouwens, ook het soortbegrip heeft in den loop der jaren aan velerlei verandering blootgestaan. Terwijl men oorspronkelijk vooral rekening hield met morphologische kenmerken bij het af-

grenzen der soorten, heeft men later meer den nadruk gelegd op den genetischen samenhang der individuen.

TOURNEFORT verdeelde de levende wezens in constante, van God geschapen *species*, die konden varieeren — deze variaties zijn nu *onze* species —, LINNÉ voerde die verdeeling verder door: een *species* van TOURNEFORT was voor hem een *genus*, terwijl later JORDAN nog verder splitste in *petites espèces*. Alle drie beschouwden hunne soorten als constant, met onwezenlijke variaties. Juist door die steeds aanwezige variaties echter kon eene indeeling naar morphologische kenmerken niet algemeen bevredigen; een zekere mate van willekeur bij het opstellen der soorten kon niet worden vermeden en zelfs de schrijver van „Origin of species" onthield zich van een definitie der soort[37].

Meer vooruitzicht bood de gedachtengang van JOHANNSEN[20]. Deze wees er op, dat de totaalheid der uiterlijk waarneembare eigenschappen (morphologische, biochemische, enz.), slechts de reactie was van het *genen*complex op de prikkel der omstandigheden, waaronder dit verkeerde. De *genen*, dragers der erfelijke substantie, ondergaan den invloed dier omstandigheden, „reageeren" ermede, en het resultaat dier „reactie" is het individu zooals zich dit aan ons voordoet. Twee identieke genencomplexen zullen nu, daar hunne levensvoorwaarden nooit geheel dezelfde zijn, zelden gelijke reactie vertoonen, en dit zou dan het feit verklaren, dat geen twee individuen ooit volkomen identiek zijn.

Individuen met hetzelfde genencomplex noemde JOHANNSEN *genotypisch identiek*, terwijl hij hun „reactie" met *phaenotypus* betitelde. En nu lag het voor de hand, als soort te beschouwen alle individuen met hetzelfde genotype.

Hoe eenvoudig en natuurlijk dit ook schijnt, in de toepassing doet zich de moeilijkheid voor, dat wij den genotypus als zoodanig niet kunnen waarnemen, doch alleen in zijn reactie, d. w. z. de kenmerken van het individu. Oogenschijnlijk zijn wij dus door deze opvatting niet verder gekomen, maar ons inzicht is dieper geworden en wij kunnen

het ons nu indenken, dat er variabiliteit moet bestaan, dat afwijkingen van den reactie-norm niet blijvend behoeven te zijn, dat uit louter phaenotypische verschijnselen niet altijd bindende conclusies getrokken mogen worden met betrekking tot de al- of niet-identiteit der individuen, enz.

Daar verondersteld mag worden, dat twee genotypisch identieke complexen, onder dezelfde omstandigheden gebracht, een gelijk phaenotype zullen vertoonen, en dat er in de natuur wel een „norm" bestaat van omstandigheden, waardoor in het algemeen een genotype zijn vast phaenotype heeft — evenals in ons klimaat het genotype „H_2O" zich gewoonlijk voordoet als het phaenotype „water" — zoo is de mogelijkheid gegeven, door de bestudeering der phaenotypen besluiten te trekken omtrent het wezen der genotypen.

Als reactie op de al- of niet-identiteit van genotypen gebruikt men bij hoogere organismen de verschijnselen, die in de vaktaal als „mendelen" worden aangeduid.

Op de wetten, door GREGOR MENDEL in 1866—1870 opgesteld, behoef ik hier niet in te gaan; slechts wil ik even aanstippen, dat zij, merkwaardig genoeg, in vergetelheid geraakten, tot zij in 1900 ongeveer gelijktijdig door CORRENS, TSERMAK en HUGO DE VRIES opnieuw werden „ontdekt" en dat hiermede het experimenteele tijdperk in de studie der evolutieproblemen aanving.

De bacteriologie heeft echter andere reagentia van noode, en ongeveer het eenige wat haar overblijft is de studie der phaenotypen: hoe zij zich gedragen bij den reactie-norm, bij afwijkende omstandigheden en in de opeenvolging der generaties.

De moderne natuurvorscher zal zich hierbij steeds bewust moeten blijven, dat hij niet werkt met veranderlijkheid van eigenschappen als grondslag voor evolutie, dat hij eigenlijk niet behoort te spreken over erfelijkheid van eigenschappen; niet de reacties immers zijn erfelijk, slechts de genen. Erfelijkheid is aanwezigheid van gelijke genen, ongeacht de verschillen in eigenschappen, en deze variabiliteit van phaeno-

typen kan dus, bij gelijkblijven van het genencomplex, nooit aanleiding geven tot evolutie, tot soortvorming[20].

In de nomenclatuur der variabiliteitsleer heerscht nog steeds een grenzelooze verwarring. De pogingen, die aangewend zijn, om de variaties te verdeelen in verschillende typen zijn vele, en reeds hieruit moge blijken, dat geen enkele voldoet. De grondslagen voor een classificatie zijn: de grootte der variatie, hare standvastigheid, ook in de opeenvolging der generaties, en hare oorzaken (uitwendige en inwendige). Al naar gelang de diverse onderzoekers één dier grondslagen als de voornaamste beschouwden, de overige secundair, naar die mate is de nomenclatuur en de indeeling verschillend.

PRINGSHEIM[48] b.v. deelt eerst in naar de oorzaak en onderscheidt *fluctuaties* (inwendige oorzaken) van *adaptaties* (uitwendige oorzaken). De eerste zijn volgens hem voor de bacteriologie van weinig beteekenis, de meeste veranderingen zijn adaptaties. Hij verwerpt ook voor de bacteriën de *mutatie* van HUGO DE VRIES, d. w. z. de sprongsgewijze variatie uit inwendige oorzaken voortgesproten, „richtungslos" en erfelijk, en beschouwt de herhaaldelijk waargenomen veranderingen, die door hun sprongsgewijs karakter wel eens „mutaties" worden genoemd, als adaptaties, daar zij met bijna wiskunstige zekerheid door wijziging der uitwendige omstandigheden voor den dag kunnen worden gebracht en duidelijk het karakter eener aanpassing vertoonen, dus niet „richtungslos" zijn. Fluctuaties zoowel als adaptaties kunnen al of niet erfelijk standvastig zijn; de niet-erfelijke adaptatie noemt PRINGSHEIM *modificatie*. Hoe grooter de adaptatie is, des te meer drukt zij haar stempel op het wezen der organismen en des te standvastiger is zij. Het zal ons nauwelijks bevreemden, dat variaties weer kunnen „terugslaan": wat eens verkregen werd, kan weer verloren worden en omgekeerd.

BEYERINCK onderscheidt naar de erfelijkheid de variaties in *modificatie* (niet-erfelijke adaptatie) en *fluctuatie* (erfelijke

adaptatie). De *mutatie* verschilt slechts quantitatief van de fluctuatie.

LEHMANN[28] noemt in navolging van NAEGELI de tijdelijke veranderingen door uitwendige oorzaken *modificaties;* voor de standvastig blijvende variaties van bacterie-klonen voert hij den naam *Klon-umbildung* in, indien de oorzaken hiervoor niet, en *Dauermodifikation,* indien zij wèl aangegeven kunnen worden; de laatste naam heeft JOLLOS ook reeds gebezigd. Klon-umbildung en Dauermodifikation zouden overeenkomen met hetgeen vroeger „mutatie" werd genoemd.

BAERTHLEIN[2] onderscheidde eerst *modificaties* en *mutaties,* gene voorbijgaand, door uitwendige oorzaken te voorschijn geroepen, deze meer standvastig. In een latere publicatie[3] laat hij deze woorden varen, en spreekt slechts van *variaties,* waarbij hij dan den graad van standvastigheid en erfelijkheid aangeeft.

Het bovenstaande moge voldoende zijn om aan te toonen, dat er nog steeds geen eenstemmigheid bestaat in de nomenclatuur: niets verwonderlijks voor zulk een jonge wetenschap als de variabiliteitsleer, waarin de inzichten nog steeds aan wisseling onderhevig zijn.

* *
*

De variabiliteit wordt gewoonlijk bestudeerd in samenhang met evolutie-vraagstukken. Doch binnen het gebied der bacteriologie is er een andere zijde aan, welke raakt aan de verbreidings-leer der ziekten.

Het heeft sinds lang de aandacht getrokken, dat vele ziekten in den loop der geschiedenis zijn opgekomen, andere weer verdwenen, dat sommige in kwaadaardigheid toe-, andere afnamen. Waar deze schommelingen gepaard gingen met eene verandering in levensomstandigheden van het slachtoffer, n.l. den mensch, daar had men aanstonds het antwoord op de vraag naar de oorzaak van het verloop eener epidemie gereed. Dat b.v. in den Amerikaanschen burgeroorlog ziekten als „trench fever", „sweating sickness" e. a. hun intrede

konden doen in de strijdende legers, om bij het sluiten van den vrede te verdwijnen, tot zij in een nieuwen oorlog weer slachtoffers maakten, wordt veelal geweten aan het verminderde weerstandsvermogen van den mensch als loopgraaf-strijder[1].

Maar indien men alleen de wijzigingen in ontvankelijkheid voor ziekten bij den mensch verantwoordelijk stelt voor het optreden of het verdwijnen van epidemieën, of voor hun goedaardig of kwaadaardig karakter, dan moet men ook besluiten tot de ubiquiteit van alle *pathogene* microben. Deze nu is allerminst bewezen.

Meer en meer neigt men daarom tot eene andere opvatting omtrent de rol der bacteriën in deze vraagstukken.

Nadat NAEGELI in 1877 de meening had verkondigd, dat de bacteriën behoorden tot één type van cel, en dat de waargenomen verscheidenheid slechts bestond uit verschillen van vorm, van grootte, van beweeglijkheid, enz., waardoor een specifieke onderscheiding op grond van morphologische en biochemische eigenschappen niet gerechtvaardigd was, bouwde COHN zijn systeem van vaste soorten op, dat al spoedig, mede gesteund door de onderzoekingen van KOCH, tot een soort dogma werd verheven. Algemeen aangenomen was dit stelsel echter nooit; mannen als HUEPPE, LEHMANN, e. a. hielden vast aan de mogelijkheid van variatie, en wezen om die reden op de moeilijkheid van een goede classificatie, terwijl hun tegenstanders waargenomen variaties beschouwden als weinigzeggende bijzonderheden. Na de beschrijving van het z.g. B. coli mutabile van NEISSER en MASSINI werden langzamerhand echter zóó vele waarnemingen over variabiliteit gepubliceerd, dat velen zich gedrongen voelden, het enge standpunt van de onveranderlijkheid der soort te verlaten.[3]

En aldus werd, behalve in de experimenteele evolutieleer, de nauwelijks aanvaarde variabiliteit van bacteriën ook getrokken in de beschouwingen omtrent epidemiologische vraagstukken.

In een voordracht, over het „grensgebied van commensalisme en parasitisme", in 1916 gehouden voor de Ned. Vereeniging voor Tropische Geneeskunde, heeft VAN LOGHEM[33] aangegeven, dat *commensalen* — d. z. gasten, die voordeel trekken, doch hun gastheer geen nadeel berokkenen — kunnen worden tot *parasieten*, die hun gastheer wèl tot schade zijn.

Die overgang kan plaats grijpen door verminderden weerstand van den gastheer, door toeneming in virulentie en door toeneming in aantal van de commensalen.

Onlangs heeft ADAMI[1] in eene monographie dergelijke opvattingen tot speculatie benut.

Uit het feit, dat men in elke groep van micro-organismen als streptokokken, diplokokken, vibrionen, enz., soorten kent, die parasitair, andere, die saprophytisch leven, dat er steeds nieuwe ziekten ontstaan, dat bacteriën zich aan hunne omgeving kunnen aanpassen, en dat deze adaptatie ook na het ophouden van den prikkel daartoe vaak erfelijk is, meent hij te mogen besluiten, dat pathogene microben ontstaan uit saprophyten, wanneer deze door een buitengewoon gunstigen samenloop van omstandigheden in de gelegenheid zijn, zich aan de voor hen anders zoo schadelijke weefselvochten aan te passen.

Groote bewijskracht kent hij in dezen toe aan de proeven van THIELE en EMBLETON met den onschuldigen B. mycoïdes, die door hen werd omgekweekt tot den pathogenen B. anthracis.

Het dient erkend, dat ADAMI zelf toegeeft, dat zulk een gebeurtenis niet-alledaagsch is.

Toch kan men de variabiliteit in pathogeniteit, zonder dat de bacillen daarbij den soortgrens overschrijden, moeilijk missen tot het verstaan van epidemiologische gegevens; en omgekeerd zouden deze ons wellicht waardevolle aanwijzingen kunnen geven met betrekking tot de veranderlijkheid der betrokken micro-organismen.

Beperken wij ons slechts tot de z.g. typhus-coligroep.

De epidemiologie der febris typhoïdea heeft ons geleerd, dat vrijwel elk ziektegeval is terug te voeren op een ander, dat dus van het virulent worden van onschuldige darm-commensalen hier nauwelijks sprake kan zijn, doch dat de virulente bacil steeds voortwoekert en geregeld slachtoffers maakt.

Anders is dit reeds bij de paratypheuze aandoeningen. Behalve infectie door reeds virulente bacteriën heeft men ter verklaring van sommige epidemieën ook de mogelijkheid moeten opperen, dat oorspronkelijk onschadelijke commensalen door allerlei omstandigheden vervormd kunnen worden tot echte parasieten, die dan wederom het uitgangspunt kunnen zijn van een contact-epidemie.

Experimenteel heeft HEUSER iets soortgelijks waargenomen bij muizen. Werden deze alleen met eiwitten gevoed, dan gingen zij ten gronde aan paratyphus-enteritis; maar de dieren, aldus ziek geworden door de toeneming in virulentie van een darm-commensaal, bleken normaal gevoede muizen te kunnen besmetten met paratyphus: dus van individueele indigestie tot epidemie. (VAN LOGHEM[33]).

Die verandering in virulentie treedt bij de colibacillosen nog meer op den voorgrond. Hierop zou hun sporadisch optreden kunnen wijzen; tot epidemieën of epizoötieën, zooals b.v. bij de „zuigelingen-diarrhoe" der runderen komt het zelden.

LAURENT[27] toonde aan, hoe voor planten oorspronkelijk onschuldige colibacillen zóó virulent gemaakt konden worden, dat zij tot infectie in staat bleken.

VAN LOGHEM[33] vond in 1909 in Deli als oorzaak van eenige op cholera gelijkende ziektegevallen een afwijkenden colibacil, door hem B. pseudocholeræ genoemd.

Het zou mij te ver voeren, indien ik alle gevallen wilde vermelden, waarin de virulentie van den coli-bacil een groote rol speelt; slechts wil ik nog herinneren aan de z.g. „alimentaire intoxicatie" bij kinderen: de vaak levensreddende werking van een injectie met polyvalent coli-serum

kan wijzen op het aandeel, dat pathogeen geworden colibacillen bij het tot stand komen van dit ziektebeeld hebben.

Aan den anderen kant mag niet uit het oog worden verloren, dat de ontvankelijkheid van mensch of dier bij de colibacillosen een groote rol speelt, grooter dan bij typhus of paratyphus. Het maakt vaak den indruk, dat de darmcolibacillen in hoofdzaak door verminderden weerstand van hun gastheer in diens weefsels kunnen binnendringen, zooals men bv. ziet bij uitputtende ziekten of in de agone. Maar de waarneming, dat juist dan de commensaal virulent kan worden, maant ons tot voorzichtigheid bij de beoordeeling van de rol van gastheer en gast.

Beschouwingen als hierboven ontwikkeld, die voor een deel reeds steun vinden in het experiment, kunnen ons van nut zijn bij het beantwoorden van de vraag, hoe men verschillende bacterieele ziekten het beste kan bestrijden. Het spreekt wel vanzelf, dat voor aandoeningen, van welker verbreiding het zwaartepunt is gelegen in *infectie* door den *virulenten* bacil (longpest, cholera), deze bestrijding anders moet zijn dan voor ziekten, waarbij de door allerlei factoren wisselende *ontvankelijkheid* van den mensch op den voorgrond treedt (croupeuze pneumonie).

* * *

Ik hoop hiermede voldoende te hebben gewezen op het groote belang, dat de variabiliteitsleer der bacteriën heeft voor de epidemiologische vraagstukken.

Vóór ik tot de bespreking van het derde punt overga, de beteekenis der variabiliteit voor de determinatie, zou ik gaarne nog het volgende willen opmerken.

Het is aan meer dan één onderzoeker opgevallen, dat geringe variaties neiging vertoonen om al heel spoedig tot het type van uitgang terug te keeren, dat zij standvastiger zijn naarmate de afwijking grooter wordt, en dat, indien de variant wordt gekenmerkt door een gelijktijdige, extreme verandering

van verscheidene eigenschappen, zij vaak zoo constant blijkt, dat sommigen dan spreken van het optreden van een nieuwe soort. Men ziet bij variabiliteitsproeven een ononderbroken rij van vormen, „anfangend bei solchen, die nur wenig beeinfluszt, und die, isoliert weiterverimpft, nach wenigen Tagen zurückschlagen, bis hinauf zu jenen, die sehr stark abgeartet sind und nur schwer oder gar nicht zur Ausgangsform sich zurückführen lassen". (BERNHARDT[5]).

Ik wijs hierbij op de proeven, genomen met B. Friedländer (TOENNIESSEN[55]), B. anthracis (BAIL[4]), B. coli (PRELL[47]), waarbij als extreme standvastige afwijkingen werden gevonden een kapsellooze, avirulente Friedländer- en anthraxbacil en de lactose-negatieve, virulente B. paracoli.

Hierbij moet wel worden bedacht, dat het begrip *standvastigheid* slechts een betrekkelijke waarde heeft.

De omstandigheden waaronder wij het gedrag van een phaenotype kunnen waarnemen, zijn, ook ten opzichte van den factor *tijd,* beperkt; dit dwingt ons tot voorzichtigheid bij het aannemen van het ontstaan van nieuwe genotypen. Veiliger schijnt het daarom, met het oog op de onbegrensde mogelijkheden in de natuur, niet al te spoedig te spreken van het optreden van een nieuwe soort, doch liever de soortgrens wat uit te rekken.

Thans nog iets over de beteekenis van de variabiliteit voor de determinatie.

Wanneer wij ons de bacteriën grofweg verdeeld denken in twee groote groepen, de parasieten en de saprophyten, dan kunnen wij ons voorstellen, dat deze laatste, die onder de zich steeds wijzigende omstandigheden in de natuur leven, in sterke mate het vermogen zullen moeten bezitten, zich daaraan aan te passen; daarentegen zal de parasiet, die op één milieu, dat weinig of niet verandert, n.l. de lichaamsvochten van den mensch, is „ingesteld", niet zoozeer dat aanpassingsvermogen behoeven.

Afgescheiden van alle teleologische en causale beschouwingen kunnen wij derhalve zeggen, dat een saprophyt een

groote variatiebreedte moet bezitten en een parasiet deze kan ontberen.

Omgekeerd zouden wij dus wellicht door het nagaan van de variatie-mogelijkheden van een bacterie eenig inzicht kunnen krijgen in zijn levensgewoonten.

De moeilijkheid doet zich echter voor, dat wij in dergelijke proeven, behalve de morphologische en de biochemische, ook de ziekteverwekkende eigenschappen van de bacteriën dienen te betrekken, en juist deze zijn voor het experiment minder toegankelijk. De resultaten van dierproeven zijn niet zonder meer toepasselijk op de toestanden bij den mensch.

Het onderzoek naar het serologisch gedrag kan ons in dezen van nut zijn; ook hier is echter voorzichtigheid geboden, want uit de proeven van TOTSUKA[56] met colibacillen weten wij, dat een agglutineerend serum, afkomstig van b.v. een konijn, niet dezelfde colistammen vermag te agglutineeren als een serum van een cavia, die met denzelfden stam is behandeld als het konijn.

LEHMANN[29] heeft betoogd, dat men bij de physiologisch-biologische onderzoekingsmethoden, in samenhang met de kliniek, meer „quantitative variations-statistische methodik" moet invoeren. Gewapend met die gegevens zou men dan langzamerhand de positie kunnen beoordeelen, die de bacteriën innemen als saprophyt of parasiet.

Ook VAN LOGHEM heeft de mogelijkheid geopperd, dat de variabiliteit — in den zin van wijzigingsvatbaarheid — een eigenschap is, die behoort bij het saprophytische karakter, en verloren gaat bij de parasieten, zooals deze zich in meer dan één opzicht kenmerken door verlies van eigenschappen.[34 35 36]

Het is nu mijne bedoeling, om te trachten in de volgende hoofdstukken door een vergelijkend onderzoek naar de veranderlijkheid van typhus-, paratyphus- en coli-bacillen gegevens te verkrijgen, waaraan deze opvatting getoetst kan worden.

II. VERANDERLIJKHEID VAN B. COLI.

Gaan wij thans na, wat in de litteratuur bekend is omtrent de veranderlijkheid van B. coli op morphologisch, biochemisch en serologisch gebied.

Morphologisch doet B. coli zich gewoonlijk voor als een kort, plomp staafje, met geringe eigen beweeglijkheid; soms is de vorm slank, of wel de bacillen groeien uit tot lange draden, hoewel dit niet zoo vaak voorkomt als bij B. typhosus, bij wien de vorming van draden tot een soortkenmerk gerekend mag worden. Ook de beweeglijkheid kan zeer levendig zijn of geheel ontbreken.

Van de kolonievormen zijn vele typen beschreven: groot en klein, doorzichtig of ondoorzichtig, ongekleurd tot geelgetint, met scherpe en gekartelde randen, alles in allerlei overgangen en combinaties. De reactie-norm, d. w. z. het type, dat wij zien, wanneer faeces van een gezond mensch op agar worden uitgestreken, is een halfondoorzichtige, sappige, lichtgekorrelde, nauwelijks grijsgetinte kolonie met gladden rand. Op den melksuiker-fuchsine-agar volgens Endo uitgestreken is de kleur op doorzicht zwart-rood, bij opvallend licht groen metaalachtig glanzend.

De variant, die in de litteratuur de meeste discussie heeft uitgelokt, is de B. coli mutabile van NEISSER en MASSINI, volgens latere schrijvers ten onrechte aldus genoemd. Een B. coli-kolonie, die oorspronkelijk bleek op de Endo-plaat groeit, vertoont na eenige dagen roode knopjes, hierdoor openbarend, dat in de populatie van individuen, die geen lactose aantasten — of zij dit *kunnen* doen, is iets anders

— eenige zijn ontstaan, die dit wèl doen. Ent men nu van het bleeke gedeelte af, dan krijgt men wederom hetzelfde te zien; ent men daarentegen van de roode knopjes af, dan ontstaan aanstonds roode kolonies. Had men oorspronkelijk de hoop gekoesterd, dat men aldus van den gewonen colibacil althans één type scherp kon afgrenzen, desnoods ook serologisch, later bleek deze verwachting ijdel.

De in de natuur aangetroffen en de uit gewone B. coli afgesplitste B. coli mutabile-stammen bleken niet tot één duidelijk begrensde groep te behooren.

Op „saccharose-Endo" heeft men ook B. coli mutabile gevonden. (EISENBERG[9])

Verder is waargenomen, dat B. coli-kolonies klein en helder kunnen zijn. Meestal gaan hiermede gepaard een teere groei op agar en verminderde koolhydraatsplitsende vermogens.

Dat men ook „bleeke coli" ziet, behoeft slechts even te worden aangestipt. Dan is een nog al eens voorkomende vorm: een heldere, platte kolonie met gekartelden rand en gerimpeld oppervlak, in het midden steil en knopvormig verheven; deze soort is bijna steeds sterk auto-agglutinabel.

Al deze van den norm afwijkende kolonie-typen zijn gekenmerkt door een min of meer tijdelijk verlies van eigenschappen: het zijn z.g. „defective" vormen (PRELL[47]). De „bleeke coli" tast geen melksuiker aan, de B. coli mutabile heeft die eigenschap voor de meeste individuen verloren, de „heldere coli" heeft aan levenskracht ingeboet, enz. En dan heeft men opgemerkt, dat die defectieve colibacillen veelal gevonden worden in de faeces van darmzieken, dus onder pathologische omstandigheden.

MAYMONE[42] isoleerde bij typhus-reconvalescenten B. paracoli en andere afwijkende vormen.

Het veelvuldig voorkomen van „bleeke coli" in de tropen is velen onderzoekers opgevallen en in verband gebracht met den toestand van chronische irritatie, waarin de darm aldaar verkeert. De B. pseudocholerae van VAN LOGHEM[33]

is evenzeer een „bleeke coli", die daarenboven zeer virulent is. Dezelfde bonte verscheidenheid van kolonie-typen, welke de Endo-plaat aanbiedt, als hierop faeces van darmzieken zijn uitgestreken, ziet men ook op een plaat afkomstig van een oude ascites-bouilloncultuur, die van één bacterie-cel is aangelegd. Het ligt voor de hand om, met PRELL, aan te nemen, dat de prikkel tot die variaties wordt geleverd door de giftige producten, die in den darm ontstaan onder pathologische omstandigheden en in oude cultures door de stofwisseling der bacteriën zelve, al kan, althans in het eerste geval, selectiewerking niet worden uitgesloten.

Het bespreken van de veranderlijkheid der kolonie brengt ons vanzelf tot de variaties op biochemisch gebied.

Het vermogen koolhydraten om te zetten, is het meest bestudeerd aan de lactose, en niet zonder reden. In de geheele typhus-coligroep kan men een duidelijke scheidingslijn trekken tusschen lactose-positieve en lactose-negatieve bacillen. Tot de laatste behooren de pathogene soorten, en in den tijd, dat de agglutinatie-reacties nog niet bekend waren, bleef het onderzoek naar het lactose-splitsend vermogen het beste middel om den pathogenen typhus - van den onschuldigen coli-bacil af te grenzen. Het is dus begrijpelijk, dat men juist het lactose-omzettend vermogen van B. coli onder allerlei omstandigheden naging.

Men heeft nu B. coli-stammen gevonden, die lactose nooit aantasten, andere, die dit zeer langzaam en zwak doen of wel op de wijze van de reeds beschreven B. coli mutabile. Verder zag men, dat „lactose-positieve" stammen onder bepaalde omstandigheden „lactose-negatief" kunnen worden, en dat deze laatste bij voortkweeken neiging vertoonen om tot het type van uitgang terug te keeren. Kortom, het lactose-splitsend vermogen, eens beschouwd als een adhaerent kenmerk van B. coli, bleek in ruime mate wisselend en voor variatie vatbaar te zijn.

PRELL onderscheidt op grond van het gedrag tegenover melksuiker drie vormen, nl. echte B. coli, de soort, die

weinig of niet varieeren kan, B. coli mutabile, die tot sterkere verandering in staat is en voorkomt zoowel in het „mutabile"- als in het „mutatum"-stadium en ten slotte de lactose-negatieve B. paracoli, die niet meer terugslaat tot het lactose-positieve type.

Zoowel paracoli- als coli-mutabilestammen zijn gekweekt uit echte colibacillen, waarmede dus het bewijs is geleverd van hunne verwantschap.

PRELL[47] veronderstelt nu, dat in den gezonden darm coli-stammen huizen met verschillend vermogen tot variatie. Onder pathologische omstandigheden komen de „mutabile" stammen onder gunstige condities en overwoekeren de echte, meer standvastige, die eerst de overhand hadden: op de Endoplaat verschijnen thans de verschillende kolonietypen als uitdrukking van het overwegen der meer variabele soorten. Bij genezing heeft het omgekeerde proces plaats. Heeft de prikkel tot wijzigingen in het lactose-omzettend vermogen te sterk getroffen, dan treden er stammen op, die, ook erfelijk, lactose-negatief blijven: B. paracoli.

Vroeger beschouwde men de knopvorming van B. coli mutabile als progressieve mutatie; thans neigt men meer tot een andere opvatting van dit verschijnsel. Als men nl. B. coli mutabile ent in een vloeibaar lactose-medium, dan treedt pas na eenige dagen daarin verzuring op. Strijkt men nu uit dit buisje, vóór dat tijdstip, van dag tot dag een oogje op Endo-agar uit, dan komen op de plaat steeds meer roode kolonies op, naarmate men later uit het cultuurbuisje heeft afgeënt. Dit zou er dus op kunnen wijzen, dat de coli-mutabile-bacillen, die eerst geen lactose omzetten, langzamerhand dit vermogen verkrijgen: er heeft onder de individuen in het vloeibare lactose-medium, waarin alle onder dezelfde omstandigheden verkeeren, een geleidelijke „Umstimmung" plaats. Dat echter op een vasten voedingsbodem schijnbaar een „mutatie" optreedt, zou toe te schrijven zijn aan locale invloeden, waardoor die „Umstim-

mung" slechts bij enkelen in de kolonie aan den dag kan treden (EISENBERG)[9].

Op een dergelijke wijze wordt ook vaak de knopvorming in typhusbacilkolonies op rhamnose-agar opgevat. (ADAMI). Deze beschouwingswijze heeft het voordeel, dat zij in overeenstemming is met hetgeen wij weten omtrent het gewennen van levende wezens aan hooge temperaturen.

In 1878 gelukte het DALLINGER een flagellaat langzaam te gewennen aan een temperatuur van 158° Fahrenheit. Selectie was hierbij niet in het spel, want, als hij den oorspronkelijken stam, waarvan hij was uitgegaan, aanstonds aan deze temperatuur blootstelde, stierven alle individuen zonder uitzondering af. Er had dus eene „Umstimmung" plaats gehad, evenals bij B. coli mutabile in lactose- en bij den typhusbacil in rhamnose-bevattende voedingsbodems.

Is dus de variabiliteit van B. coli, met name wat het lactose-omzettend vermogen betreft, in het algemeen groot, onder de leden der coli-groep bestaat in dezen verschil; en zooals later blijken zal, is dit evenzeer het geval met de wijzigingsvatbaarheid, d.i. het vermogen om door variatie te reageeren op den prikkel der veranderde uiterlijke levensvoorwaarden.

Het splitsingsvermogen t. o. van andere koolhydraten is nog weinig onderzocht. Wel maakt het den indruk, dat B. coli de minste variabiliteit vertoont in de eigenschappen, die het met de andere, meer parasitair levende leden van den typhus-coligroep gemeen heeft, b.v. de glucose-omzetting. Indien er, wat wel plausibel is, binnen die groep phylogenetische samenhang bestaat, dan komt zulk een gedrag ons eenigszins begrijpelijk voor, als wij bedenken, dat de typhusbacil, die in verband met zijne parasitaire levenswijze eigenschappen heeft verloren, juist die het allereerst heeft laten vallen, die bij zijne saprophytische verwanten het meest aan wijziging onderhevig zijn; en zoo zoude men zich dan omgekeerd kunnen voorstellen, dat juist uit het feit, dat de typhusbacil glucose-positief en lactose-negatief is, het lactose-omzettend vermogen bij den

colibacil labieler moet zijn dan dat om glucose te vergisten.

Ik geef echter dadelijk toe, dat zulke beschouwingen sterk overhellen naar speculatie, en slechts verontschuldigd kunnen worden door de poging om aldus verschillende verschijnselen onder één gezichtspunt saam te vatten.

* * *

Tot dusverre heb ik aangenomen, dat vast staat wat een een colibacil is. Feitelijk is het begrip B. coli niet scherp omschreven. Onder den naam B. coli communis ESCHERICH verstaan wij gewoonlijk een organisme, dat behalve andere, hier minder ter zake doende kenmerken, saccharose niet, dulciet wèl vermag om te zetten.

In het algemeen kan men de „coli-achtigen" in twee groepen verdeelen. Reeds ESCHERICH scheidde zijn B. coli communis van B. lactis aërogenes, op grond van den plomperen vorm, de onbeweeglijkheid en het sterkere melkcoagulatievermogen van den laatsten. Deze geringe verschillen bleken later met andere in correlatie te staan, zoodat thans velen spreken van een „coli"- en een „aërogenesgroep". Deze onderscheidt zich van den coligroep, behalve door de reeds genoemde kenmerken, door kapselvorming, een positieve reactie van VOSGES en PROSKAUER, en door de productie uit koolhydraten van een gasmengsel, dat twee maal zooveel CO_2 als H_2 bevat; terwijl de coligroep ongeveer evenveel CO_2 als H_2 maakt (WINSLOW, KLIGLER en ROTHBERG[57]). Vooral Engelsche en Amerikaansche onderzoekers hebben zich met eene indeeling der „colon-bacteria" beziggehouden.

Binnen de coligroep is eene verdeeling lastiger door te voeren, door wisselende combinaties van deels labiele eigenschappen. WINSLOW c. s. onderscheiden naar het gedrag tegenover saccharose en dulciet 4 groepen, en wel:

Saccharose	—	dulciet	+	. B. coli communis ESCHERICH.
»	—	»	—	B. acidi lactici GROTENFELDT.
»	+	»	+	B. coli communior DURHAM.
»	+	»	—	B. neapolitanus FRAENKEL.

In de aërogenesgroep onderscheiden zij de B. cloacae JORDAN van de B. lactis aërogenes ESCHERICH.

LEVINE[30] heeft een dergelijk systeem, hij gebruikt echter saccharose en salicine om in de coligroep onderverdeelingen te maken.

MC. CONKEY[39] splitst met behulp van saccharose en dulciet de „lactosefermenting bacteria in faeces" in 4 typen, en wel in B. coli communis, B. coli communior, B. acidi lactici en B. aërogenes.

JACKSON[19] en FITZGERALD[13] doen hetzelfde. De laatste heeft berekend, dat B. coli communis en communior tezamen 93 % van de darmflora uitmaken.

Zooals later zal blijken, heb ik voor mijne proeven zoowel saccharose-negatieve als -positieve colibacillen gebruikt; door het ontbreken van dulciet kan ik ze niet nader aanduiden, doch waarschijnlijk zijn het de gewone darmbewoners, type communis en type communior, die ongeveer in gelijke mate voorkomen. Moge dit rechtvaardigen, dat ik mij bij het isoleeren mijner stammen niet angstvallig heb beperkt tot de klassieke B. coli communis ESCHERICH.

Daar nu de aërogenesgroep met betrekking tot hare fermentatieve vermogens verder van de pathogene soorten als typhus en paratyphus afstaat dan de coligroep, ligt het voor de hand na te gaan of zij niet meer dan deze neigt tot een saprophytisch bestaan, minder vaak ziekten verwekt, en of zij meer voor wijziging vatbaar is. Voor zoover mij bekend, is hieromtrent niets positiefs gepubliceerd; dat men zoo zelden hoort van „aërogenes-bacillosen", kan hieraan worden toegeschreven, dat de micro-organismen van de aërogenesgroep weinig met den mensch in aanraking komen.

De variaties, die de coli-achtigen vertoonen in suikersplitsend vermogen, zijn van practisch belang gebleken. Sinds EIJKMAN heeft aangetoond, dat water waarin zich microben bevinden, die in staat zijn om bij 46° C. glucose te vergisten, op zijn minst verdacht is voor een faecale verontreiniging van recenten datum, is over dit onderwerp veel geëxperimenteerd en veel geschreven.

Herhaaldelijk voor onbruikbaar verklaard, bleek deze methode toch meermalen voor de practijk van het wateronderzoek een groote waarde te bezitten (FLU[11]); en die opvatting wordt gesteund o.a. door de vondst van ROSSI en CALENDOLI[50], die aantoonden, dat versch uit den darm geïsoleerde colibacillen, die in staat waren bij 46° C. te groeien en glucose te vergisten, bij voortkweeken langzamerhand dit vermogen inboetten.

In een andere richting hebben MC. CONKEY[40], CLEMESHA[7] e. a. getracht de verschillen, die de colibacillen vertoonen in hun koolhydraat-splitsend vermogen, dienstbaar te maken aan het wateronderzoek voor hygiënische doeleinden.

CLEMESHA kwam na een uitgebreid experimenteel onderzoek tot de slotsom, dat van versch verontreinigd water de „glucose-lijn" even hoog lag als de „lactose-lijn", d.w.z. dat de in dat water aanwezige bacillen bijna alle „glucose + lactose +" waren. Na verloop van tijd nu vindt men in dat water steeds meer „glucose + lactose—"-bacillen, en als gevolg hiervan ziet men de lactose-lijn zich van de glucose-lijn verwijderen. Het ligt voor de hand, dat dit verschijnsel niet uitsluitend zijn oorzaak vindt in variatie, doch ook in de overwoekering van sommige soorten door andere — bacillus P van CLEMESHA — wanneer zij uit den darm in het water geraken onder gewijzigde levensomstandigheden.

Op grond van de waarneming, dat colibacillen door allerlei invloeden als zonlicht, slechte voeding en dgl. steeds meer hun gasvormend vermogen inboeten, heeft HENNINGSON[17] gemeend, dat het mogelijk is door *meting* van het door de waterbacteriën geproduceerde gas een inzicht te verkrijgen in den graad van verontreiniging van water.

Uit alles blijkt wel dat men, niet altijd zonder succes, voor practische doeleinden gebruik heeft kunnen maken van de variabiliteit der colibacillen op biochemisch gebied.

In dit verband wil ik niet onvermeld laten, dat ook getracht is serologische verschijnselen te gebruiken voor het hygiënisch wateronderzoek. Indien men colibacillen tezamen

kweekt met typhusbacillen, kunnen de eerste eenigszins en *voorbijgaand* agglutinabel worden door typhus-agglutinatie-serum[53]. Dergelijke „paragglutinabele" colistammen zijn ook gevonden in de ontlasting van typhuslijders. Sommige onderzoekers gingen er daarom toe over te beproeven of niet uit de agglutinabiliteit van de in water aangetroffen colibacillen door verschillende sera kon besloten worden tot het al-of-niet ver terugliggen van een verontreiniging met verdacht materiaal. Veel schijnt dit tot dusverre niet te hebben opgeleverd. (HORROCKS[18]).

Wenden wij ons thans tot de serologische verschijnselen, die men bij colibacillen aantreft. In vergelijking met typhus- en paratyphusbacillen is hierover zeer weinig gepubliceerd. Wat daarin het meest naar voren treedt, zijn de wisselende en geringe specificiteit der agglutinatie-verschijnselen en de zeldzame vondst van agglutininen in het menschelijk lichaam bij coli-bacillosen.

RADZIEFSKY[49] heeft na uitvoerige proefnemingen kunnen aantoonen, dat er scherp en minder scherp begrensde B. coli-stammen bestaan. Sommige agglutineerende sera sleepten, behalve de homologe stam, nog tot 40 à 50 % van andere willekeurige B. coli-stammen mede, een andere practisch geen enkele. (Zie ook ROTHBERGER[51]). Opvallend was, dat die serologisch zoo begrensde stam afkomstig was uit de urine van een patiënt aan cystitis.

Zoo heeft ook VAN LOGHEM er op gewezen, dat de verschillende door hem in Deli geïsoleerde pseudocholera-stammen in agglutinatorisch opzicht bij elkander behoorden.

Het blijkt dus wel, dat er onder de vertegenwoordigers van de coligroep in dezen groote verschillen bestaan.

Ook wat de vorming van agglutininen betreft is er weinig eenvormigheid te ontdekken.

ACHARD[58] b.v. kon niet met alle coli-stammen goede sera bereiden; en bij colibacillosen zijn nu eens wèl, dan weer geen agglutininen bij den gastheer gevonden; wellicht hangt dit samen met de meerdere parasitaire of saprophytische

rol, die B. coli bij dergelijke ziekten speelt. (Vgl. blz. 10 en 11).

Op de wisselingen in agglutinabiliteit kom ik later, bij de vermelding der proeven van VAN LOGHEM met kloonsera terug.

In dit verband mag ik de onderzoekingen van TOTSUKA[56] niet onbesproken laten.

TOTSUKA bereidde met een B. coli-stam uit menschelijke faeces een agglutineerend serum, en onderzocht hiermede wekelijks 32 versch geïsoleerde stammen uit de ontlasting van denzelfden persoon, waarbij hij dan als positief resultaat een duidelijke uitvlokking met een serumverdunning 1 : 100 beschouwde. Het bleek hem nu, dat het aantal agglutinabele stammen in de faeces van week tot week aan sterke wisselingen onderhevig was en in het algemeen verminderde.

TOTSUKA neigde, ter verklaring van dit verschijnsel, meer tot het aannemen van eene labiliteit in het receptorenapparaat van den colibacil dan tot de veronderstelling, dat er in den darm een oneindig groot aantal B. coli-soorten aanwezig waren.

Naar in het volgende hoofdstuk zal blijken, heb ik onderzoekingen gedaan van gelijke strekking.

III. WIJZIGINGSVATBAARHEID VAN B. COLI.

Tot een juiste waardeering van variabiliteitsverschijnselen in de natuur kan het experiment niet worden ontbeerd; doordat men het dan in de hand heeft de voorwaarden voor eene proefneming zoo eenvoudig mogelijk te maken, kan de invloed van selectie geheel worden buitengesloten en aldus worden nagegaan, hoe de micro-organismen met wijziging van eigenschappen reageeren op den prikkel der uiterlijke levensvoorwaarden.

JOHANNSEN[20] is de eerste geweest, die gewezen heeft op de noodzakelijkheid om bij dergelijke proeven uit te gaan van een „reine Linie".

Hoe hoog deze noodzakelijkheid wordt aangeslagen, moge hieruit blijken, dat men naar het schijnt niet zonder eenigen grond van waarheid aan HUGO DE VRIES heeft kunnen verwijten, dat hij bij zijn baanbrekende proeven met Oenothera Lamarckiana heeft gewerkt met „heterozygotisch" materiaal. (LOTSY, BATESON[38] e. a.) Vele der waargenomen „mutaties" zouden dan slechts splitsingsproducten volgens MENDEL zijn geweest. Intusschen twijfelt nauwelijks iemand aan het bestaan van echte *mutaties* en aan haar belang voor de evolutieleer.

Ook JOHANNSEN zelf heeft door toepassing van zijn beginselen kunnen aantoonen, dat de wet van GALTON — n.l. dat individuen, die naar den plus- of minus-kant van den norm afwijken, een nakomelingschap hebben, die naar denzelfden kant afwijken — alleen geldt voor populaties,

niet voor „reine Linien"; het is een statistische wet en vindt veelal haar oorzaak in selectie.

De chemicus dient bij zijne proeven uit te gaan van een *scheikundig zuivere stof*, de bioloog van een *reine Linie*, de bacterioloog van een *kloon* (JOHANNSEN).

Het begrip „kloon" is door WEBBER ingevoerd voor de op vegetatieve wijze zich voortplantende wezens. Strikt genomen, ontbreekt het bewijs, dat de kloon een niet-hybridische natuur bezit, daar wij haar niet op „mendelen" kunnen onderzoeken. Met deze bijgedachte kennen wij haar echter in de experimenteele variabiliteitsleer dezelfde waarde toe als aan een „reine Linie" (LEHMANN[28]).

Er zijn verscheidene methoden aangegeven om klonen of één-cel-culturen te verkrijgen, door SCHOUTEN, BURRI e. a.

Ik bepaal mij er toe, hier te vermelden, dat door mij steeds de z.g. „plaatmethode" is gevolgd, waarover bacteriologen als EISENBERG, BAERTHLEIN en vele anderen zich tevreden hebben betoond. Het komt mij daarom ook overbodig voor deze werkwijze te beschrijven en de grondslagen, waarop zij berust, uiteen te zetten.

In mijne hierna te vermelden proeven heb ik mij moeten bepalen tot de waarneming van een beperkt aantal verschijnselen op het gebied van morphologie, biochemie en serologie.

Van de morphologische kenmerken werden aangeteekend het uiterlijk der kolonie op Endo-agar, de vorm en de beweeglijkheid der bacillen; van de biochemische het gedrag tegenover lactose en saccharose, soms ook t.o. van glucose, en de indolvorming.

Serologisch werden agglutinabiliteit en complementbindingsvermogen nagegaan.

Tot de keuze van de hierboven genoemde biochemische kenmerken heb ik mij laten leiden door de overweging, dat het lactose-splitsend en het indolvormend vermogen juist eigenschappen zijn, waardoor B. coli van de pathogene soorten kan worden afgegrensd, terwijl binnen de coligroep

het gedrag t.o. van saccharose en dulciet veelal wordt benut tot het onderscheiden van enkele typen: zooals reeds gezegd ontbrak mij echter het dulciet.

Ik heb dan mijn stammen aan invloeden van drieërlei aard blootgesteld, en nagegaan, op welke wijze zij daarop reageerden.

Ten eerste bewaarde ik hen in eene oplossing, waarin zij slechts een sober bestaan konden voeren; daartoe werd gekozen een vloeistof, die behalve eenige minerale zouten, 2 $^0/_{00}$ asparagine bevatte en zorgvuldig geneutraliseerd was. Hierin werden de stammen geënt, de buisjes in de broedstoof geplaatst, totdat een duidelijke troebeling aantoonde, dat groei had plaatsgegrepen; dit was meestal na 3 à 4 dagen het geval, hetgeen wel er voor pleit, dat van intensief leven geen sprake was. De cultures werden dan in de ijskist gezet en zijn daarin, op een enkele uitzondering na, gedurende ruim 10 maanden in leven gebleven.

Ten tweede werd aan de stammen volop gelegenheid gegeven, een zoo weelderig mogelijk leven te leiden. Zij werden tot dit doel gekweekt op gewone voedingsagar, en herhaaldelijk, om de 4 à 8 dagen, overgeënt, om hun steeds rijkelijk voedsel te bieden.

Op dit zelfde beginsel berust de cultuur in lichaamsvochten. Bacteriesuspensies worden in een collodiumzakje in de buikholte van een konijn gebracht en daarin gedurende eenigen tijd gelaten; de lymphe-stroom kan deels door het collodium diffundeeren en de bacteriën voeden, die door het omhulsel beveiligd zijn tegen den aanval van leucocyten. Voor de nadere beschrijving van deze methode, zooals zij in het Instituut voor Tropische Hygiëne te Amsterdam wordt toegepast en ook door mij is aangewend, verwijs ik naar het proefschrift van KORTHOF[25].

Ten derde heb ik de bacteriën blootgesteld aan den invloed van hun eigen giftige stofwisselings-producten. BAERTHLEIN[3] bewaarde hiertoe zijne stammen maandenlang in gewonen bouillon en zag dan herhaaldelijk het optreden

van varianten, hoofdzakelijk op morphologisch gebied. Ik koos ascites-bouillon, in de hoop, dat het eiwit uit het ascites-vocht in sterkere mate toxische ontledingsproducten en aldus ook krachtiger prikkel tot variatie zoude opleveren, en een suspensie van koeienfaeces in water, een milieu, waarin colibacillen in de natuur wel vaak zullen leven.

De ascites-bouillon (bouillon, ascitesvocht $\overline{aa}$) werd op de gewone wijze bereid en op steriliteit nagegaan.

De koeienfaeces-suspensie werd zóó dun gemaakt, dat zij gemakkelijk te behandelen was; daarop werd zij, over buisjes verdeeld, op 3 achtereenvolgende dagen telkens één uur lang bij 110° C. gesteriliseerd, en den overigen tijd in de broedstoof geplaatst. Vervolgens werd weer zorgvuldig de steriliteit gecontroleerd.

Mijn B. coli-klonen heb ik, volgens de plaatmethode, verkregen uit faeces en urine. Steeds isoleerde ik 10 klonen tegelijkertijd, die ik in asparagine-oplossing bewaarde, totdat ik ze kon onderzoeken met een agglutineerend serum, dat met één harer bereid was. Bleek dan hare identiteit,dan gebruikte ik voor de proeven verder slechts de homologe stam, zoo niet, dan betrok ik hierin ook een afwijkende kloon.

De agglutineerende sera werden verkregen, door konijnen intraveneus te behandelen met bij 70° C. gedoode bacteriesuspensies, afkomstig van 24 uur oude agarcultures, telkens geënt van de „asparagine-stammen" uit de ijskast. De immuniseering werd voortgezet, totdat de agglutinatietiter 1 : 1000 à 3000 bedroeg. Het serum, gewonnen door verbloeding van het konijn uit de Art. femoralis, werd, over buisjes verdeeld, op ijs bewaard.

Op deze wijze naar VAN LOGHEM'S voorbeeld handelend, heb ik sera verkregen, waaraan het karakter van een *kloonserum* moet worden toegekend, en vermeden, dat daarin door eventueel in een „stamcultuur" voorhanden andere klonen, elementen optraden, waardoor men van een *populatie-serum* zou moeten spreken.

De op de hierboven beschreven wijze gekweekte stam-

men werden nu van tijd tot tijd in 10 (soms 20) klonen „gesplitst", en deze splitselingen onderzocht ik dan alle morphologisch, biochemisch en serologisch.

Vorm en eigen beweging der bacteriën werden nagegaan in een hangenden druppel uit een 24 uur oude 1 % peptonwatercultuur. Hierin zocht ik, zoo noodig na verscheidene dagen, met ERHLICH'S reagens ook naar indolvorming.

Het gedrag t. o. van lactose en saccharose werd zichtbaar gemaakt in peptonwater, waarbij 1 % suiker en 5 % lakmoesoplossing (Kahlbaum) was gevoegd.

De agglutinatiereacties voerde ik uit met levende bacterie-suspensies van een 24 uur oude agarcultuur. Ik gebruikte 5 serum-verdunningen, 1 : 30, 1 : 100, 1 : 300, 1 : 1000, 1 : 3000 en een controle (suspensie zonder serum). De sterkte der agglutinatie is uitgedrukt in cijfers, n.l.:

4 = clarificatie;
3 = zwaar vlokkig neerslag, vloeistof niet geheel helder;
2 = minder zwaar neerslag, vloeistof flink troebel;
1 = even waarneembaar neerslag;
0 = geen neerslag.

Door de voor elk buisje gevonden cijfers naast elkander te plaatsen, kan men op gemakkelijke wijze het resultaat van een agglutinatie aanteekenen en van het papier aflezen.

Een voorbeeld: Hieronder staat, dat de agglutinatie bedraagt 44210 Co. Dit wil dan zeggen: clarificatie met de serum-verdunningen 1 : 30 en 1 : 100, matige uitvlokking met de verdunning 1 : 300, even waarneembaar neerslag met de verdunning 1 : 1000, geen neerslag met de verdunning 1 : 3000 en in het controlebuisje (C).

In de allermeeste gevallen bleek de agglutinatie pas na 24 uur, bij een temperatuur van 37° C. te zijn afgeloopen.

De complementbindingsreacties voerde ik uit naar het voorbeeld van de Wassermann-reactie, en wel met gelijke hoeveelheden antiformine-„extract" (Uhlenhuth) van bacillen, 1 % kloonserum-oplossing en cavia-complement in stijgende concentraties, benevens 5 % bloedlichaampjes-suspensie en

10 à 12 titereenheden haemolytisch serum. Hiernaast kwamen controles ter bepaling van de hoeveelheid complement, benoodigd voor haemolytisch systeem, het extract en voor normaal konijneserum. Uit deze laatste cijfers, en uit de bij de eigenlijke reactie gevonden waarden kan men de sterkte van de complementoplossing, die deelneemt aan de binding met extract en kloonserum, berekenen, en de complementbinding dus uitdrukken in procenten.

* * *

Het is mijne bedoeling niet, al mijne protocollen hier uitvoerig weer te geven, hetgeen begrijpelijk is, als men bedenkt, dat ik van mijne B. coli-stammen ongeveer 1100 splitselingen heb onderzocht, en daarmede ruim 3300 agglutinatiereacties heb uitgevoerd.

Ik zal daarom de verkregen resultaten in eenige tabellen samendringen.

A. *B. coli-stammen, afkomstig uit faeces P.* (♂).

Stam P I.

Op 20 April 1919 geïsoleerd. De 9 andere, gelijktijdig uit dezelfde faeces gekweekte stammen bleken daarmede identiek.

Endo, flinke, ronde, metaalachtig glanzende kolonies.
Morphologie, flinke, plompe staafjes.
Eigen beweging, gering.
Lactose, zuur en gas (1 dag).
Saccharose, nihil.
Indolvorming, + (2 dagen).
Serologisch is deze stam scherp begrensd.

TABEL I. (Stam P I).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum P I, titer 44210 Co.	Complement-binding met kloonserum P I.
Asparagine Agar	» [1])	»	»	»	»	»	»	6 %
	soms enkele kleinere en bleekere kolonies	»	»	»	»	»	de kleine kolonies wat minder agglutinabel	12 %
Koeienfaeces	als boven	»	»	»	»	»	als boven	
Ascites-bouillon	als boven, doch veel vaker	»	»	»	»	»	als boven; een kleine, inagglutinabele kolonie wordt als P III verder gekweekt	

[1]) » duidt aan, dat het gedrag steeds onveranderd is gebleven.

Stam P III.

Op 10 Juni 1919 afgesplitst uit de ascites-bouilloncultuur van stam P I. Het is niet gelukt, met deze kloon een agglutinatie-serum te bereiden van eenigszins hoogen titer.

De agglutinabiliteit door de kloonsera P I, P II en P IV bedroeg nihil.

Endo, kleine, ronde, metaalachtig glanzende kolonies, die na 2 dagen speldeknopgroot zijn.

Morphologie, kleine, slanke staafjes.

Eigen beweging, nihil.

Glucose, zonder gasvorming na 3 dagen ontleed.

Lactose, nihil (1 week).

Saccharose, idem.

Indolvorming, idem.

TABEL II. (Stam P III).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door de kloonsera P I, P II, P IV.	Complement-binding met kloonserum P I.
Asparagine	»	»	»	»	»	»	—	0
Agar	na 6 maanden alle splitselingen teruggeslagen tot het type P I						—	0
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»	—	
Ascites-bouillon	herhaaldelijk splitselingen, die tot het type P I zijn teruggeslagen						—	

Stam P II.

Op 19 Juni 1919 geïsoleerd. Werd door het kloonserum P I niet uitgevlokt.

De morphologische en biochemische eigenschappen kwamen geheel overeen met die van stam P I.

Serologisch is deze stam niet zeer scherp begrensd.

TABEL III. (Stam P II).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum P II, titer 44443 Co.	Complement-binding met kloonserum P II.
Asparagine	»	»	»	»	»	»	na 5 maanden: 00000 Co.	7.5 %
Agar	»	»	»	»	»	»	na 6 maanden: 00000 Co.	6 %
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»	na 5 maanden: 00000 Co.	
Ascites-bouillon	allerlei kolonie-typen	»	»	»	»	»	in het algemeen onveranderd; de splitselingen worden ook *meer agglutinabel* door *andere sera*, als P I, P IV, T II, H I; een inagglutinabele splitseling wordt als P IV verder gekweekt.	
Weefselvochten (na 3 maanden verblijf)	ronde, heldere, bleeke kolonies	lange staafjes	geen	ontleed na 1 week	»	weinig	00000 Co. – 11100 Co. *door serum K IV en H I sterker agglutinabel*, tot 32221 Co. toe	
		na één agarpassage weer als vroeger						

Stam P IV.

Op 6 Augustus 1919 afgesplitst uit de ascites-bouilloncultuur van stam P II. Had dezelfde biochemische en morphologische kenmerken, doch werd door het kloonserum P II niet beïnvloed, en was evenmin als stam P II serologisch scherp begrensd.

TABEL IV. (Stam P IV).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum P IV, titer 33221 Co.	Complement-binding met kloonserum P IV.
Asparagine	enkele kleinere en witte kolonies.	»	»	»	»	»	na 3 maanden: 00000 Co.—11100 Co.	6.5 %
Agar	als voren	»	»	»	»	»	na 4 maanden: 21110 Co.—22211 Co. enkele splitselingen sterk agglutinabel door *verscheidene andere sera*	1.5 %
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»	na 4 maanden: 10000 Co.—11100 Co.	
Ascites-bouillon	»	»	»	»	»	»	in het algemeen onveranderd. Enkele inagglutinabele en auto-agglutinabele kolonies; verscheidene splitselingen sterk agglutinabel door *vele andere sera*	

B. *B. coli-stammen, afkomstig uit faeces T.* (♀).

Stam T I.

Op 4 Juni 1919 werden uit deze faeces 7 klonen gekweekt van het type T I, 3 van het type T II.

Endo, groote, ronde, metaalachtig glanzende kolonies.

Morphologie, slanke staafjes.

Eigen beweging, levendig.

Lactose, zuur en gas (1 dag).

Saccharose, zuur, geen gas.

Indolvorming + + (1 dag).

De serologische afgrenzing was niet zeer scherp.

TABEL V. (Stam T I).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonseum T I, titer 33322 Co.	Complement-binding met kloonserum T I.
Asparagine	»	»	»	»	zuur en gas	»	na 6 maanden: 11100 Co.—22110 Co.	o
Agar	»	»	»	»	id.	»	na 6 maanden: 00000 Co.	o
Koeienfaeces	»	»	»	»	id.	»	na 6 maanden: 11100 Co.	
Ascites-bouillon	enkele kleinere en enkele witte kolonies	»	»	»	id.	»	na 6 maanden: 11100 Co.—22110 Co. de *witte kolonies* zijn *goed agglutinabel door serum H I*	
Weefselvochten (na 3 maanden verblijf)	ronde, heldere, bleeke kolonies	lange staafjes / geen — na één agarpassage weer als vroeger		vergist na 3 dagen	nihil	weinig	00000 Co.—22200 Co. *door serum H I en K IV sterker agglutinabel,* 22221 Co.—33222 Co.	

Stam T II.

Gelijktijdig geïsoleerd met stam T I, en van deze verschillend door zijn onvermogen om saccharose om te zetten en door een ander serologisch gedrag, dat ook scherp begrensd was.

TABEL VI. (Stam T II).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum T II, titer 44321 Co.	Complement-binding met kloonserum T II.
Asparagine	»	»	»	»	»	»	»	12.5 %
Agar	»	»	»	»	»	»	»	13 %
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»	»	
Ascites-bouillon	»	»	»	»	»	»	» enkele kolonies zijn ook *sterk agglutinabel* door verscheidene *andere sera*	

Stam T III.

Op 25 Juni 1919 geïsoleerd. Werd noch door serum T I, noch door serum T II geagglutineerd. Het is niet gelukt met deze stam een kloonserum te bereiden.

Endo, kleine, ronde, witte kolonies.
Morphologie, slanke staafjes.
Eigen beweging, nihil.
Lactose, zuur, *geen gas* (1 dag).
Saccharose, zuur, *geen gas* (2 dagen).
Indolvorming, gering.

TABEL VII. (Stam T III).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonsera T I en T II.	Complement-binding met kloonserum T I.
Asparagine	»	»	»	»	Zuur en gas	veel	»	o
							enkele auto-agglutinabele kolonies	o
Agar	»	»	»	»	id.	veel	»	
Koeienfaeces	»	»	»	»	id.	veel	enkele splitselingen *agglutinabel door verscheidene sera,* T I, T II, P IV, H I	
Ascites-bouillon	»	»	»	»	id.	veel	als voren	

C. *B. coli-stam, afkomstig van urine H.* (♂, *pyelitis*).

Stam H I.

Op 8 Juni 1919 geïsoleerd met 9 andere, daarmede identische klonen.
Endo, groote, ronde, bleeke kolonies.
Morphologie, korte, plompe staafjes.
Eigen beweging, gering.
Lactose, zuur en gas (12 dagen).
Saccharose, nihil.
Indolvorming, + (2 dagen).

Er bestaat een vrij ver gaande en scherp serologische verwantschap met den B. coli-stam K IV.

TABEL VIII. (Stam H I).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum H I, titer 33222 Co.	Complement-binding met kloonserum H I.
Asparagine	»	»	»	wat sneller	»	»	na 6 maanden: 11100 Co.	1 %
Agar	»	»	»	id.	»	»	na 6 maanden: 11000 Co.	0
Koeienfaeces	»	»	»	id.	»	»	na 6 maanden: 11000 Co.	
Ascites-bouillon	»	»	»	id.	»	»	na 6 maanden: 11100 Co.	
Weefsel-vochten (na 3 maanden verblijf)	»	lange staafjes	geen	id.	»	»	» behalve door serum K IV ook *meer agglutinabel door andere sera*	
		na één agarpassage weer als vroeger						

D. *B. coli-stammen uit koeienfaeces.*

Stam K I.

Op 13 Mei 1919 werden uit koeienfaeces 4 klonen van het type K I, 6 van het type K II geïsoleerd.

Endo, groote, ronde, metaalachtig glanzende kolonies.
Morphologie, groote, plompe staafjes.
Eigen beweging, gering.
Lactose, zuur en gas (1 dag).
Saccharose, nihil.
Indolvorming, + + (1 dag).
Deze kloon is vrij sterk agglutinabel door verscheidene andere sera.

TABEL IX. (Stam K I).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum K I, titer 44432 Co.	Complement-binding met kloonserum K I.
Asparagine	»	»	»	»	»	»	»	o
Agar	»	»	»	»	»	»	»	o
Koeienfaeces	enkele witte kolonies	»	»	de witte nihil	»	de witte minder	de witte kolonies, *serologisch begrensd*, en afwijkend van K I, *overeenkomend met H I*; als K IV verder gekweekt	
Ascites-bouillon	allerlei kolonie-typen	»	»	»	»	»	na 6 maanden sommige goed-, andere inagglutinabel	
Weefselvochten (na 3 maanden verblijf)	25 % witte kolonies	lange staafjes	nihil	de witte nihil	»	de witte minder	de roode kolonies: onveranderd de *witte kolonies: van het type K IV*	
		na één agarpassage weer geheel als vroeger						

Stam K III.

Is uit stam K I (ascites-bouilloncultuur) afgesplitst, en onderscheidde zich door zijne sterke agglutinabiliteit door paratyphus B-serum. Dit verdween na verloop van tijd weer.

Stam K IV.

Op 25 Juni 1919 uit de koeienfaeces-cultuur van stam K I afgesplitst. Onderscheidt zich van deze door bleeke groei op Endo-agar, gemis van lactosesplitsend vermogen, geringe indolvorming.

Verder wordt de stam *niet uitgevlokt door serum K I*, en is, in tegenstelling met stam K I, *serologisch vrij scherp begrensd*.

Er bestaat serologische verwantschap met de stammen H I, T I en P II; wat de beide laatste aangaat, slechts nadat zij in *weefselvochten waren gekweekt*.

Op 7 November 1919 wordt een *ook serologisch met K IV geheel overeenstemmende* stam afgezonderd uit de collodiumzakjes-cultuur van stam K I.

TABEL X. (Stam K IV).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum K IV, titer 33331 Co.	Complement-binding met kloonserum K IV.
Asparagine	»	»	»	zuur en gas na 3—7 dagen	»	»	na 6 maanden: 11110 Co.	1 %
Agar	»	»	»	id.	»	»	na 6 maanden: 11100 Co.	1 %
Koeienfaeces	»	»	»	id.	»	»	na 6 maanden: 11110 Co.	
Ascites-bouillon	»	»	»	id.	»	»	na 6 maanden: 11000 Co.	

Stam K II.

Gelijktijdig geïsoleerd met stam K I, en evenmin als deze serologisch scherp begrensd.

Verschilt van stam K I door zijn vermogen, om saccharose zonder gasvorming om te zetten en door een ander serologisch gedrag.

TABEL XI. (Stam K II).

Cultuur-medium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum K II, titer 33221 Co.	Complement-binding met kloonserum K II.
Asparagine	»	»	»	»	gas	»	na 7 maanden: 11110 Co.	1 %
Agar	»	»	»	»	id.	»	na 7 maanden: 11110 Co.	1 %
Koeienfaeces	»	»	»	»	id.	»	na 7 maanden: 22110 Co.	
Ascites-bouillon	allerlei kolonie-typen	»	»	»	id.	»	na 9 maanden: 11110 Co. enkele splitselingen zijn zeer *goed agglutinabel gebleven*	0 5 %

Om eenigszins een denkbeeld te geven van hetgeen bij het splitsen

der klonen werd gevonden, vermeld ik hierna twee — verkorte — protocollen en wel van de ascites-bouilloncultuur op 21 December 1919 en op 2 Februari 1920.

TABEL XII.

Kolonies.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum K II.	Agglutinabiliteit door kloonserum K I.	Complementbinding met kloonserum K II.
21/12 No. 1	helder, gekarteld	gelijk vroeger	idem	idem	idem	idem	33333 C 3	33333 C 3	
» 2	»						33333 C 3	33333 C 3	
» 4	»						44444 C 4	44444 C 4	
» 6	rond, groenglanzend						44332 C o	22100 C o	
» 8	»						44331 C o	11000 C o	
2/2 No. 1	»						*44321 C 1*	11111 C 1	*5* %
» 2	»						*11111 C 1*	11111 C 1	*o*
» 4	»						11000 C o	00000 C o	
» 5	»						44330 C o	00000 C o	
» 6	»						11000 C o	00000 C o	

Stam K V.

Een op 6 Augustus 1919 in de ascites-bouilloncultuur van stam K II aangetroffen kloon, die slecht agglutinabel bleek door het kloonserum K II, doch morphologisch en biochemisch geen afwijkingen vertoonde, werd onder den naam „K V" nader onderzocht.

TABEL XIII. (Stam K V).

Cultuurmedium.	Endo.	Morphologie.	Eigen beweging.	Lactose.	Saccharose.	Indol.	Agglutinabiliteit door kloonserum K V, titer 33322 Co.	Complementbinding met kloonserum K V.
Asparagine	enkele gekartelde kolonies en enkele witte	»	»	»	gas	»	na 4 maanden: 11110 Co. de gekartelde kolonies auto-agglutinabel	1 %
Agar	idem	»	»	»	id.	»	idem	1 %
Koeienfaeces	idem	»	»	»	id.	»	idem	
Ascites-bouillon	meer variatie in kolonietypen	»	»	»	id.	»	idem	

Mijne resultaten, die uit den aard der zaak niet alle uit bovenstaande tabellen zijn te lezen, kan ik samenvatten in de navolgende conclusies:

1°. Er bestaan stammen, tot de coli-groep behoorende, die scherp omgrensd zijn (stam P I en T II), andere, die van meer dan één agglutineerend serum den invloed ondervinden (stam K I).

2°. De eerstgenoemde hebben hunne agglutinabiliteit en hun complementbindingsvermogen onder de meest verschillende omstandigheden behouden, de laatste hebben beide in meerdere of mindere mate verloren.

3°. Nu eens blijft de agglutinabiliteit het beste bewaard (stam K I), dan weer het complementbindingsvermogen (stam P II); soms ook werden beide gezamenlijk verminderd aangetroffen (stam K II).

4°. Deze vermindering heeft niet steeds over alle individuen tegelijkertijd plaats; uit tabel XII b.v. blijkt wel, dat naast goed- ook slecht-agglutinabele kolonies optreden, die overeenkomstige verschillen vertoonen in complementbindingsvermogen.

5°. Dit laatste feit bewijst, dat, althans in de bedoelde gevallen, die vermindering *niet* is toe te schrijven aan het onwerkzaam worden van het kloonserum.

6°. Van tijd tot tijd treden in de verschillende culturen, schijnbaar willekeurig, splitselingen op, die door verscheidene andere coli-sera kunnen worden geagglutineerd.

7°. Het afsplitsen van den stam P III uit P I en van den stam K IV uit K I moet beschouwd worden als eene „Klonumbildung".

8°. Morphologische en biochemische afwijkingen hebben neiging, om terug te keeren tot het type van uitgang (stam P III, en de collodiumzakjes-culturen der stammen P II, K I en T I); op serologisch gebied is daarvan niets gezien (stam P III; zie overigens sub 6°.).

9°. Met biochemische veranderingen naar den „minuskant", zooals die zijn waargenomen bij de stammen P II,

T I en K I na kweeking in weefselvochten, en bij het afsplitsen van den stam K IV uit K I, ging samen eene toenadering op agglutinatorisch gebied tot een anderen, reeds biochemisch „defectieven" stam, H I.

Hierbij kan ik wijzen op de overeenkomst met de waarneming van VAN LOGHEM[33], dat zijne bij verschillende gelegenheden geïsoleerde pseudocholera — defectieve coli — stammen alle serologisch tot één groep behoorden, en met die van GROOT[16], die in het Instituut voor Tropische Hygiëne te Amsterdam kon aantoonen, dat uit den chaos van volwaardige B. proteusstammen enkele biochemisch defectieve tot één serologisch goed begrensd type (B. proteus anindologenes VAN LOGHEM) konden worden afgezonderd.

10°. Veranderingen in het kolonie-type zijn het veelvuldigst waargenomen in de ascites-bouillonculturen, (prikkel door stofwisselingsproducten?) die ook het meest auto-agglutinabele stammen opleverden.

11°. De door mij aangewende methode om kloonsera te verkrijgen is minder juist gebleken. Doordat ik n.l. telkens, wanneer een konijn een intraveneuze injectie moest ontvangen, opnieuw afentte van den „asparaginestam", en deze cultuur dan inspoot, heb ik de kans geloopen, dat ik bij elke volgende injectie een eenigszins andere „kloon" gebruikte, zoodat dus het verkregen serum het karakter kon aannemen eer van een *populatieserum* dan van een kloonserum. Dat dit gevaar niet denkbeeldig is, bewijzen wel de verschuivingen op serologisch gebied, die bij vele stammen, ook in de asparagineculturen, zijn geconstateerd. Wellicht moet hierin de verklaring worden gezocht van de door enkelen (ACHARD[58]) en ook door mij opgedane ervaring, dat niet alle B. coli-stammen een bruikbaar agglutineerend serum opleveren: indien n.l. die serologische verschuivingen zóó snel plaats hebben, dat voor elke volgende injectie een *geheel andere kloon* wordt gebezigd, is het denkbaar, dat op deze wijze nooit een goed agglutineerend serum kan worden verkregen.

Juister zou het misschien zijn, indien men van een kloon een hoeveelheid „vaccin" bereidde, ruim voldoende voor immunisatie en voor titerbepaling, en tot dat doel alleen dit vaccin aanwendde.

Ook uit — niet gepubliceerde — onderzoekingen van VAN LOGHEM blijkt dit eigenaardige gedrag. Wanneer hij, uitgaande van één-celculturen van verschillende B. coli-stammen, met deze klonen konijnen immuniseerde, zag hij soms op zeker tijdstip verschil tusschen het bewaarde en het versche serum in het vermogen om de splitselingen van de betreffende kloon te agglutineeren. In zulke gevallen werden splitselingen *allen* door het *versche* serum, doch slechts *voor een deel* door het *oude* serum geagglutineerd. De verklaring van dergelijke uitslagen zou deze kunnen zijn: de kloon bezit een variabel receptoren-apparaat, de splitselingen raken aldus langzamerhand en min of meer den moederlijken stempel kwijt. Tijdens de immuniseering bevat een serum de meeste tegenstoffen tegenover die individuen, waarmede het dier het kortst geleden is ingespoten; bewaart men zulk een serum, terwijl intusschen nieuwe generaties zijn gevormd, dan kunnen deze hun verband met dit serum verloren hebben. Het versche serum daarentegen past hun beter; het vertegenwoordigt jongere generaties, waarmede zij nauwer verwantschap hebben.

Dergelijke proeven — die echter, zooals verwacht kan worden, volstrekt niet met elken stam slagen — zijn een bevestiging van wat ik zelf in de vorige bladzijden kon vermelden over serologisch vastgestelde veranderlijkheid.

* * *

Gelijktijdig met deze proeven deed ik een onderzoek naar het gedrag van B. coli-stammen in hun natuurlijk milieu, den menschelijken darm. Naar het voorbeeld van TOTSUKA heb ik van 2 personen, P en T, op gezette tijden de B. coli-stammen uit de faeces nagegaan met behulp der — ook tot andere doeleinden benutte — kloonsera P I, T I en T II.

Het bleek mij nu, dat de agglutinabiliteit der in het verloop van tijd geïsoleerde stammen, *geleidelijk afnam*, doch dat ook wel eens plotseling een kolonie werd aangetroffen, die door geheel andere B. coli-sera werd geagglutineerd.

Dit gedrag is te zien in onderstaande tabel, die verkort mijne protocollen weergeeft.

TABEL XIV.

	Datum van het onderzoek.	Volgnummers der kolonies.	Agglutinabiliteit door de kloonsera.				
			P I.	P II.	T I.	T II.	H I.
Faeces P. .	20—4—19	No. 1—10	42200 Co				
	25—5—19	» 1—10	31000 Co				
	10—6—19	» 1—10	21000 Co				
	19—6—19	» 1—10	11000 Co				
	22—10—19	» 1	00000 Co	00000			00000
		» 9	00000 Co	*22100*			00000
		» 10	00000 Co	00000			*22000*
Faeces T. .	4—6—29	No. 1—7			33332 Co		
		» 8—10			11000 Co		
	25—7—19	» 1—10			21000 Co		
	22—10—19	» 1		00000	00000 Co	00000	*11000*
		» 2		00000	11000 Co	00000	*11000*
		» 7		*33100*	00000 Co	00000	00000

Dit gedrag van uit de faeces telkens versch geïsoleerde stammen vertoont een bedriegelijke overeenkomst met dat van klonen, die kunstmatig worden voortgekweekt, hetgeen blijkt uit de proeven, zoowel van VAN LOGHEM als van mij zelven; in beide gevallen geleidelijke afneming der agglutinabiliteit, met plotseling optreden van stammen, die den invloed van andere sera min of meer ondervinden.

Deze overeenkomst met het gedrag van klonen is m. i. een groote steun voor de opvatting, reeds door TOTSUKA gehuldigd, dat de wisselingen in de darmflora, althans voor een deel, kunnen worden toegeschreven aan labiliteit van het receptoren-apparaat.

Het maakt ook den indruk, dat die onbestendigheid eer in den darm tot uitdrukking komt dan een vitro; tenminste, de stammen P I en T II, die, kunstmatig voortgekweekt, zoo standvastig bleken te zijn, verdwenen — serologisch gesproken — langzamerhand uit de faeces.

IV. VERANDERLIJKHEID EN WIJZIGINGS-VATBAARHEID VAN B. TYPHOSUS EN B. PARATYPHOSUS.

In tegenstelling met B. coli is de typhusbacil een micro-organisme met zeer standvastige eigenschappen ; de litteratuur over variabiliteitsverschijnselen is dan ook bescheiden van omvang.

Slechts eenige van deze wil ik hier bespreken, met name die, welke ook in in mijn proeven tot uiting zijn gekomen; voor een uitgebreid overzicht verwijs ik naar EISENBERG[9].

De „klassieke" kenmerken van den typhusbacil, d. z. die, welke op onze gewone voedingsbodems aan den dag treden, kunnen onder andere levensomstandigheden gewijzigd zijn.

Op aardappel en gelatine groeit het slankgevormde staafje uit tot lange draden ; zelf heb ik eens gezien hoe in een bouilloncultuur, gemaakt van het bloed van een typhus-patiënt, slechts lange, onbeweeglijke draden waren te zien, gevormd door met elkander samenhangende bacillen, op de wijze van B. anthracis.

De anders zoo levendige eigen beweging kan geheel ontbreken, vooral bij pas uit het lichaam gekweekte stammen.

Echter zijn deze afwijkingen labiel, wat evenzeer het geval is met de biochemische variaties ; als merkwaardigheid kan ik vermelden, dat het gelukt is den typhusbacil indol te laten vormen (ADAMI[1]) en melksuiker te doen vergisten (PENFOLD[45]).

Bekend is de *knopvorming*, die aan typhusbacilkolonies op rhamnose-agar geregeld na ongeveer 5 dagen wordt waargenomen. Terwijl zij eerst als een „mutatie"-verschijnsel was beschouwd, neigen thans vele onderzoekers er toe, om haar evenals de knopvorming van B. coli mutabile op te vatten als een „Umstimmung", die in vloeibare kweekmedia *alle* individuen treft, op agar slechts bij *enkele* aan den dag treedt (ADAMI). Dit gedrag op rhamnose-agar, dat behalve bij B. typhosus, zeer zeldzaam bij eene andere bacterie is waargenomen, wordt ook wel eens als diagnosticum gebezigd.

De koolhydraatomzettende vermogens, meestal van negatieven aard, zijn, zooals reeds werd opgemerkt, zeer standvastig; later, bij de bespreking van den paratyphusbacil, kom ik nader terug op de kwestie van de plaats, die de op B. typhosus — zoowel biochemisch als serologisch — gelijkende micro-organismen innemen.

Wat het gedrag t. o. van stikstofverbindingen betreft, de typhusbacil groeit eigenlijk alleen goed in peptonen, in de meer samengestelde albumosen, albuminen en dgl. Echter wordt ook aangegeven, dat amido-verbindingen worden benut. (FISCHER[12]).

GASZNER[14] heeft onlangs aangetoond, dat *alle* typhusstammen „amidopositief" zijn en b.v. asparagine kunnen aangrijpen, en dat er in dit opzicht met paratyphus- en colibacillen slechts quantitief onderscheid bestaat. Met dat al blijkt wel, dat amido-verbindingon voor den typhusbacil in het algemeen een slecht voedsel zijn; er zijn echter stammen, die hierin zeer weelderig groeien en dit kan ook gezegd worden van ammoniumverbindingen en nitraten. (VAN LOGHEM[32], KISCH[22]).

Hierop berust de samenstelling van den voedingbodem van PROSKAUER en CAPALDI, waarbij asparagine, en van dien van Seitz, het surrogaat van de lakmoeswei van PETRUSCHKY, waarbij ammoniumsulfaat wordt aangewend tot differentieering van de leden van de typhus-coligroep.

Als uitdrukking dier verhoogde „amido"- of „ammonium-

positiviteit" ziet men soms in de lakmoeswei van PETRUSCHKY een alkalischen omslag (VAN LOGHEM[32]). Door vele anderen daarentegen wordt het voorkomen van dit verschijnsel bij echte typhusbacillen ten eenenmale ontkend. Zelf heb ik dit echter bij mijne stammen, die ik meerendeels in de laatste 4 jaar heb geïsoleerd, ook geconstateerd, en eveneens waargenomen, dat bij verscheidene dit „paratyphus-achtig" gedrag is opgetreden, nadat ik wegens den heerschenden vleeschnood gedurende eenigen tijd paardevleeschbouillon- of placenta-agar voor de overenting benutte. Wellicht is dit laatste niet zonder invloed geweest.

Van mijne 22 B. typhosus-stammen gedroegen zich eind 1919 niet minder dan 11 aldus afwijkend in lakmoeswei.

Het blijkt dus wel, dat de typhusbacil een zekere variabiliteit kan vertoonen in zijn vermogen om verschillende stikstofverbindingen te assimileeren.

* * *

Alvorens ik mijne B. typhosus-klonen aan dezelfde invloeden blootstelde als de B. coli-stammen, ten einde hare wijzigingsvatbaarheid te leeren kennen, heb ik eerst den samenhang tusschen agglutinabiliteit en agglutinogeniteit nagegaan. Meestal wordt de eerste als variabel opgegeven, de laatste als zeer standvastig en zeer specifiek. (RUFUS COLE[8], MAURO JATTA[41]). Tot dat doel immuniseerde ik 6 konijnen met 3 stammen, die t. o. van één agglutineerend serum aanmerkelijke verschillen vertoonden in sterkte en snelheid van agglutinatie. Het bleek ook mij, dat de verkregen sera, ongeacht de verschillen in agglutinabiliteit der voor de immunisatie gebezigde stammen, zich t. o. van een aantal (14) andere stammen op overeenkomstige wijze gedroegen. Duidelijk komt dit aan het licht, als men de immuniseering aanvangt met kleine hoeveelheden gedoode bacillen-suspensie ($^1/_{50}$ — $^1/_{20}$ platinalus), en dan na eenige weinige injecties het gedrag der sera nagaat. Bij voortgezette behandeling, wanneer de titer 1 : 20.000 à 1 : 50.000 bedraagt, vallen die verschillen grootendeels weg.

Ter illustratie geef ik het agglutinatieprotocol van 2 sera, het eerste verkregen na 3 injecties met eene geringe hoeveelheid suspensie van den goed agglutinabelen stam Ty 5, het laatste na 2 injecties met den slecht agglutinabelen Ty 6.

TABEL XV.

Serum.	Stam.	Serum-verdunning.												Contrôle.
		10	20	50	100	250	500	1000	2000	5000	10000	25000	50000	
Konijn Ty 5	Ty 5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	—	—	—
»	Ty 6	3	3	2	2	2	1	—	—	—	—	—	—	—
Konijn Ty 6	Ty 5	4	4	4	4	4	4	4	3	—	—	—	—	—
»	Ty 6	2	2	2	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—

Voor mijne proeven gebruikte ik 4 stammen, en wel:

Ty 2. Afkomstig van KRAL, en reeds meer dan 10 jaar in het Laboratorium van het Marinehospitaal te Willemsoord aanwezig. In 1918 werd voor het eerst opgemerkt, dat deze stam in lakmoeswei van PETRUSCHKY (KAHLBAUM) na aanvankelijke verzuring, een alkalischen omslag veroorzaakte. Bij splitsing op 8 Mei 1919 vond ik 40 % ammoniumpositieve en 60 % ammoniumnegatieve klonen. *) Beide bleken in gelijke mate agglutinabel door de — later te vermelden — typhus- en paratyphuskloonsera.

Ik heb nu verder gebruik gemaakt van een ammoniumnegatieve kloon.

Ty 13. Werd 1 October 1917 gekweekt uit het bloed van een typhuspatiënte te den Helder. Dadelijk na isoleering gedroeg de stam zich „klassiek", echter maakte hij lakmoeswei rooder en troebeler dan gewoonlijk, ongeveer op de wijze van B. paratyphosus A, ook zonder daarin later een

*) Hierbij gebruikte ik een vloeistof, die behalve eenige minerale zouten, slechts 0.2 % wijnsteenzuur, 1 % glucose en 5 % lakmoesoplossing van KAHLBAUM bevatte en geneutraliseerd was met NH_3. Wanneer in dit medium typhusbacillen zich goed ontwikkelen, dan wordt dit aan ons kenbaar gemaakt door de troebeling en de roode verkleuring (wegens de splitsing van glucose).

blauwen omslag te veroorzaken. In 1918 werd dit voor het eerst opgemerkt.

Bij splitsing der „populatie" op 7 Mei 1919 waren 100 % der splitselingen ammoniumpositief, doch slechts 20 % maakten lakmoeswei alkalisch. Alle gedroegen zich op dezelfde wijze met de reeds boven genoemde kloonsera.

Ty 18. Op 2 September 1918 geïsoleerd uit het bloed van een typhuslijder in het Marinehospitaal te Willemsoord. Heeft alle klassieke eigenschappen van den typhusbacil; bij splitsing op 5 Juni 1919 worden slechts ammonium-negatieve klonen aangetroffen, die geen verschillen in agglutinabiliteit door kloonsera vertoonden.

Ty 19. Op 7 September 1919 uit het bloed van een anderen patiënt te Willemsoord gekweekt. Evensals Ty 18 een klassieke stam, die bij splitsing op 5 Mei 1919 slechts ammonium-negatieve, even sterk agglutinabele klonen opleverde.

Van de 4 klonen, uit 4 verschillende stammen afkomstig, die op wijzigingsvatbaarheid werden onderzocht, waren er derhalve 2 ammonium-negatieve uit populaties van denzelfden aard (Ty 18, Ty 19), 1 ammonium-positieve en 1 ammonium-negatieve uit populaties, waarin individuen waren aangetroffen, die ammonium-tartraat als voedsel konden benutten (Ty 13, Ty 2).

De klonen werden, op overeenkomstige wijze als B. coli, gekweekt op agar, in koeienfaeces-suspensie, ascites-boullon en in weefselvochten.

Nagegaan werden: het uiterlijk der kolonies op Endo-agar, de vorm en de eigen beweging, het gedrag t.o. van glucose, manniet, NH_4-tartraat en soms ook van lakmoeswei, en de agglutinabiliteit door typhus- en paratyphus- kloonserum.

Het typhus-kloonserum is bereid met de kloon Ty 2.

Vermelding verdient, dat de klonen Ty 2 en Ty 13, afkomstig uit biochemisch afwijkende stammen — wat betreft het gedrag t.o. van ammonium-tartraat — door het paratyphus-kloonserum in zeer sterke mate werden geagglutineerd.

Het resultaat der onderzoekingen, verricht met 480 splitselingen, is uit achterstaande tabel te zien.

In het kort samengevat, werd dus gevonden:

1°. De morphologische eigenschappen bleken zeer standvastig. Na 3 maanden kweeken in weefselvochten waren de bacillen echter lang en onbeweeglijk geworden; na één agarpassage keerden zij terug tot het „normale" type. Een enkele maal kwam op de Endoplaat een gekartelde kolonie voor, die auto-agglutinabel was.

2°. Ook de biochemische kenmerken waren constant. De ammonium-positieve kloon Ty 13 leverde echter na verloop van tijd verscheidene ammonium-negatieve splitselingen op, en deze laatste deden zich zelfs uitsluitend voor, wanneer een bepaalde kweekmethode (in weefselvochten) werd gevolgd.

3°. De agglutinabiliteit door Ty-serum was aan geringe schommelingen onderhevig. Na de „konijnenpassage" nam die door paratyphus-serum toe, zelfs zóó, dat zij sterker was dan die door Ty-serum. Na agarpassages verdween dit echter min of meer.

* * *

Op 6 Juni 1919 trof ik in de ascites-bouilloncultuur van de kloon Ty 13 een aanmerkelijk afwijkende kolonie aan; later heb ik daarin verscheidene gezien.

Die kolonie was ietwat kleiner dan de andere typhuskolonies, droog, hoornachtig, met gegolfden rand en sterk gerimpeld oppervlak, en kon in toto van de Endoplaat worden afgelicht. Zij bestond uit korte, onbeweeglijke staafjes. De werking door het typhus-serum was niet na te gaan, daar er geen goede, homogene suspensie van te maken was. De bacillen ontleedden glucose na 5 à 7 dagen zonder gasvorming, maakten de lakmoeswei dadelijk blauw onder vorming van en vliesje, en splitsten uit pepton geen indol af; zij waren dus „alkaligenesachtig".

Daar naar mijne meening deze kolonie overeenkwam met de door LINGELSHEIM[31], GILDEMEISTER[15] e. a. beschreven „Q-vormen", heb ik haar „Ty 13Q" genoemd.

TABEL XVI.

Kloon. Kweekbodem.	Endo.	Morphologie. Eigen beweging.	Gedrag t. o. van		Agglutinabiliteit door	
			koolhydraten.	NH_4-tartraat.	Ty-kloonserum.	Paratyphus-kloonserum.
Ty 2.				*negatief.*	*44443 Co.*	*44420 Co.*
Agar	»	»	»	»	»	43200 Co
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»
Ascites-bouillon	»	»	»	»	»	»
Weefselvochten (dadelijk na 3 maanden verblijf)	»	lang, onbeweeglijk	»	»	»	44444 Co
Na eenige agarpassages	»	»	»	»	»	43200 Co
Ty 13.				*positief.*	*44432 Co.*	*44310 Co.*
Agar	»	»	»	minder NH_4 + klonen	44443 Co	33100 Co
Koeienfaeces	»	»	»	idem	»	»
Ascites-bouillon *)	»	»	»	bijna alle NH_4 —	22110—44443 Co	22110 Co
Weefselvochten (dadelijk na 3 maanden verblijf)	»	lang, onbeweeglijk	»	alle NH_4 —	44443 Co	44443 Co
Na eenige agarpassages	»	»	»	alle NH_4 —	44443 Co	44320 Co
Ty 18.				*negatief.*	*44432 Co.*	*20000 Co.*
Agar	»	»	»	»	»	»
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»
Ascites-bouillon	»	»	»	»	22211—44442 Co	»
Weefselvochten (dadelijk na 3 maanden verblijf)	»	lang, onbeweeglijk	»	»	»	44433 Co
Na eenige agarpassages	»	»	»	»	»	43210 Co
Ty 19.				*negatief.*	*44321 Co.*	*21000 Co*
Agar	»	»	»	»	»	»
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»
Ascites-bouillon	»	»	»	»	22110—44432 Co	32210—21000 Co
Weefselvochten (dadelijk na 3 maanden verblijf)	»	lang, onbeweeglijk	»	»	44443 Co	44432 Co
Na eenige agarpassages	»	»	»	»	44443 Co	43200 Co

*) Na 1 maand trad een afwijkende vorm op, Ty 13Q genoemd.

Bij voortkweeken op agar veranderde langzamerhand het uiterlijk der kolonies. Eerst werden er gezien, die meer vlak waren, dan zag ik enkele, waarvan de rand slijmig was, vervolgens werden meer slijmige vormen aangetroffen, en ten slotte, na 4 maanden, leverde de agarcultuur slechts typen op, die in uiterlijk niet te onderscheiden waren van typhus-kolonies. Tegelijkertijd waren de bacillen even beweeglijk geworden als typhus-bacillen.

De biochemische eigenschappen zijn evenwel tot nu toe (April 1920) onveranderd gebleven.

Zoodra de bacillen tot een homogene suspensie waren af te wrijven, heb ik hiermede een kloonserum bereid (titer 44443 Co), en toen kon ik constateeren, dat nòch door agglutinatie-, nòch door complementbindingreacties eenige verwantschap aan den dag trad tusschen Bac. typhosus, dezen stam Ty 13Q, en een B. faecalis alkaligenes-stam, dien ik uit het Instituut voor Tropische Hygiëne te Amsterdam had ontvangen.

De vraag rijst nu, hoe men zich het optreden van dien Q-vorm moet voorstellen.

Men zou kunnen meenen, dat ik bij mijne proeven niet ben uitgegaan van een kloon, maar van een mengsel van typhus- en Q-bacillen, en bij de verschillende kweekmethoden nu eens deze, dan gene overheerschten. Met zekerheid kan deze mogelijkheid niet worden uitgesloten, maar er tegen pleit, dat reeds vroeger herhaaldelijk van den stam Ty 13 een „reincultuur" is gemaakt, en dat de voor de proeven benutte kloon zorgvuldig volgens de plaatmethode is geïsoleerd.

Meer voor de hand liggend is het daarom, dit optreden toe te schrijven aan variatie.

Het is misschien niet geheel toevallig, dat die Q-vorm juist optrad in een kloon van een typhusstam, die zooals hier boven vermeld is, zich nog al labiel had betoond in zijn gedrag t. o. van stikstofverbindingen. Geheel de lijn volgend van den gedachtengang van TOENNIESEN[55], BERNHARDT[5] e. a.

zou men zich dan kunnen voorstellen, dat onder den invloed van gewijzigde levensvoorwaarden in die cultuur eerst varianten optreden op biochemisch gebied, die serologisch echter niet afwijken, en dat door krachtiger en langdurige prikkels eindelijk enkele individuen in zóó sterke mate biochemisch en serologisch veranderen, dat hiermede een zekere graad van erfelijke standvastigheid gepaard gaat.

De mogelijkheid van een terugslag tot het van uitgang kan niet worden ontkend, vooral daar deze is waargenomen bij de Q-vormen, die ontstaan zijn uit paratyphus- en colibacillen (GILDEMEISTER[15]).

Voor de opvatting „variatie" pleit ook de nauwe samenhang, die in de natuur bestaat tusschen den typhusbacil en de alkaligenesachtigen. Met name in de faeces van typhuslijders worden beide vaak naast elkander aangetroffen (KOLLE & HETSCH[23]). Ook SCHMITZ[54] heeft onlangs gewezen op beider verwantschap, in genetisch opzicht.

In October 1919 ben ik in de gelegenheid geweest een waarneming van gelijken aard te doen. Uit het door venaepunctie verkregen bloed van een 10-jarigen jongen, die ziek lag met de klassieke symptomen van een „febris typhoïdea", kweekte ik lange, zeer levendig beweeglijke bacillen. Bij nader onderzoek bleken deze bacillen geen sporen te vormen, Gram-negatief te zijn, gelatine niet te vervloeien. *Biochemisch* gedroegen zij zich *geheel als de stam Ty 13 Q.* Bij de eerste uitzaaiing op een Endo-plaat kwamen ook *slechts typische Q-kolonies* op, die bij verder voortkweeken op agar eveneens meer en meer slijmig werden.

Nadat met dien stam „W" een agglutineerend serum was gemaakt, kon ik tusschen dezen en stam Ty 13 Q slechts geringe serologische verwantschap aantoonen, en in het geheel geene met B. typhosus, B. faecalis alkaligenes, en B. paratyphosus B.

Het serum van den lijder, die weldra overleed, agglutineerde nòch typhus- nòch paratyphus-bacillen: de werking op Bac. „W" is tot mijn spijt niet nagegaan.

Hier hadden wij dus een ziekte, klinisch geheel overeenkomend met febris typhoïdea, waarbij in het bloed „alkaligenesachtige" bacillen werden aangetroffen; doordat met deze bacillen de reactie van Widal niet is uitgevoerd, staat hunne beteekenis voor de pathogenese echter niet geheel vast.

* * *

Voor een goed overzicht van de bij den paratyphusbacil waargenomen variaties, verwijs ik naar EISENBERG[9].

Hier wil ik slechts enkele bespreken.

Meer dan bij den typhusbacil worden afwijkingen in het uiterlijk der kolonie waargenomen, sommige standvastig, andere steeds gedeeltelijk terugkeerend tot het uitgangstype. De bekendste kolonievormen zijn wel de ronde, druppelvormige, troebele en de meer vlakke, heldere met gekartelden rand.

Op biochemisch gebied heeft men z.g. „gaslooze" stammen, die uit glucose geen gas vormen. Soms zijn deze direct uit faeces gekweekt, (OETTE[43], OHNO[44]), soms ook ging het gasvormend vermogen na herhaalde overentingen pas verloren (LOEWENTHAL, SELIGMANN). PENFOLD verkreeg dit zelfde bij kweeking op monochlooracetaat-agar.

Van andere biochemische variaties vermeld ik slechts, dat het TWORT gelukt is, den paratyphusbacil saccharose te doen omzetten, en dat in de populatie-stam Straatsburg door VAN LOGHEM klonen werden aangetroffen, die indol vormden en zich afwijkend gedroegen in lakmoeswei.

Van meer belang zijn de variaties op serologisch gebied. Terwijl men slechts één — serologische — soort kent van het type „typhusbacil", treft men in de natuur er verscheidene aan, die biochemisch en morphologisch tot de paratyphusachtigen moeten worden gerekend, doch in serologisch opzicht in verschillende min of meer scherp afgegrensde groepen kunnen worden gerangschikt. RUSS en TRAWINSKI[52] isoleerden b.v. uit paardemest 77 stammen, die serologisch tot niet minder dan 25 typen behoorden!

Ook in eenmaal geïsoleerde en kunstmatig voortgekweekte

stammen zijn verschuivingen op agglutinatorisch gebied waargenomen. SOBERNHEIM en SELIGMANN zagen in een B. paratyphosus-cultuur langzamerhand individuen optreden, die naderden tot het Gärtner-type. De RUMFLETH- en HAUSTEDT-stammen, die serologisch apart stonden, verschoven meer en meer naar den kant van B. enteritidis Gärtner. Op de waarnemingen van VAN LOGHEM in dit opzicht kom ik nog later terug.

Men heeft ook kunnen constateeren, dat paratyphus-bacillen in zóó sterke mate door typhus-serum werden geagglutineerd, dat men hierin een overgang naar het B. typhosus-type heeft gezien, vooral als deze varianten dan nog „gasloos" waren (BAERTHLEIN). Echter moet bedacht worden, dat men op deze wijze een factor van willekeur invoert.

Er bestaan varianten, die biochemisch, andere die serologisch tot den typhusbacil naderen. Deze eigenschappen komen geheel onafhankelijk van elkaar voor, hetgeen evenwel niet belet, dat zij ook beide bij één individu worden aangetroffen. In een zoodanig geval gaat men te ver, door dan te spreken van „echte typhusbacillen", hoogstens mag men deze „typhus-achtigen" noemen (VAN LOGHEM[35]).

Voor het onderzoek naar de wijzigingsvatbaarheid bezigde ik 4 stammen, n.l.

B 1. Afkomst onbekend; is reeds minstens 10 jaar in het Laboratorium van het Marinehospitaal te Willemsoord aanwezig.

Bij de splitsing der populatie op 14 Mei 1919 bleken 100 % der splitselingen gas te produceeren uit glucose, doch slechts 45 % uit manniet. Geen enkele vormde indol.

Op de Endoplaat waren alle kolonies van het heldere, gekartelde type. Er bestond auto-agglutinabiliteit, maar de invloed van verschillende sera die bij alle gelijk bleek te zijn, kon toch na 3 uur nog geconstateerd worden.

Voor de proefnemingen werd een kloon gebruikt, die uit manniet *geen* gas vormde.

B 2. Afkomstig uit Rotterdam, waarschijnlijk uit de Rijksserum-inrichting, en wordt al minstens 10 jaar geregeld overgeënt.

Bij de splitsing der populatie op 5 Juni 1919 vond ik 90 % kolonies van het ronde, 10 % van het gekartelde type. 100 % vormde gas uit glucose, 85 % uit manniet, geen enkele splitste indol uit pepton af.

Er waren geen verschillen in agglutinabiliteit door paratyphus B-kloonserum, evenmin door Gärtner-serum. De gekartelde kolonies bleken sterk auto-agglutinabel.

Ik gebruikte voor de proeven een kolonie van het ronde type, die manniet zonder gasvorming ontleedde.

B 9. Deze stam is door prof. VAN LOGHEM in 1906 uit Straatsburg meegebracht en door hem gebruikt bij zijne proefnemingen met kloonsera. Hierbij kwam aan het licht, dat de stam als eene „populatie" moest worden opgevat: na splitsing was er tusschen de splitselingen menig verschil op te merken uit biochemisch oogpunt.

Met het serum van den stam — *populatieserum* — gedroegen zij zich alle volkomen gelijk, met het serum van een anderen, als „kloon" op te vatten paratyphus B-stam daarentegen groepeerden zij zich in twee groepen, die serologisch weinig overeenkomst meer met elkaar hadden en ook biochemisch verschillen opleverden.

Van dezen paratyphusstam „Straatsburg" heb ik in 1918, toen ik dezen splitste, een enkele kolonie, die een gekarteld voorkomen had, verder gekweekt.

In Mei 1919 heb ik die aldus verkregen cultuur nogmaals gesplitst. Weer kwamen naast ronde ook gekartelde kolonies op, en één van de laatste heb ik voor mijne proeven gebruikt. (Zooals later zal blijken, kwam dit type overeen met het SCHUYTENVOERDER VII-type uit VAN LOGHEM's proeven).

Alle kolonies maakten gas uit glucose en manniet, geen

enkele vormde indol. Voor zoover niet door spontane uitzakking de agglutinabiliteit werd gemaskeerd, bleek deze voor alle kolonies dezelfde te zijn.

B 10. Deze stam, waarvan de afkomst mij onbekend is, heb ik uit het Instituut voor Tropische Hygiëne te Amsterdam ontvangen.

Bij splitsing op 14 Mei 1919 kwamen slechts ronde kolonies op, die alle glucose en manniet met gasvorming ontleedden, en geen indol uit pepton afsplitsten.

In agglutinabiliteit door paratyphus B kloon- en Gärtnerserum zag ik geen verschillen.

De kweekmethoden waren dezelfde als reeds beschreven voor den typhusbacil.

Nagegaan werden: de kolonievorm op de Endoplaat, de morphologie en eigenbeweging, het gedrag t. o. van glucose en manniet, de indolvorming en de agglutinabiliteit door paratyphus B- en typhuskloonserum en door een Gärtnerserum, dat ik uit Centraal Laboratorium te Utrecht had ontvangen.

Het Paratyphus B-kloonserum is bereid met de voor de proefnemingen gebezigde kloon — van het auto-agglutinabele type — uit den stam B 9; het typhuskloonserum is hetzelfde als voor het onderzoek der typhusbacillen werd gebruikt.

De resultaten van het onderzoek naar de veranderingen bij 450 splitselingen zijn te lezen uit de navolgende tabel.

Er is dus gevonden:

1°. overgang van het gekartelde kolonietype in het ronde, en omgekeerd; het eerste bleek vaak zóó autoagglutinabel, dat de invloed van de verschillende sera niet kon worden nagegaan;

2°. na kweeking in weefselvochten bevatten de collodiumzakjes slechts lange, onbeweeglijke bacillen; door één agarpassage werden deze weer teruggebracht tot het klassieke type;

TABEL XVII.

Kloon. Cultuurmedium.	Endo.	Morphologie. Eigen beweging.	Gasvorming uit		Indol vorming.	Agglutinabiliteit door		
			Glucose.	Manniet.		Paratyphus-kloonserum.	Gärtner serum.	Typhus-kloonserum.
B 1.	*gekarteld*		+	—		*44443 C 1*	*22111 C 1*	*22111 C 1*
Agar	»	»	»	alle +	»	»	»	
Koeienfaeces	»	»	»	+ en —	»	»	»	
Ascites-bouillon	rond en gekarteld	»	»	alle +	»	»	»	
Weefselvochten (na 3 maanden verblijf)	alle rond	lang onbeweeglijk	»	alle +	»	»	»	44320 C o
Id. na agarpassage		»				»		32100 C o
B 2.	*rond*		+	—		*44432 C o*	*21000 C o*	*21000 C o*
Agar	»	»	»	alle +	»	»	»	
Koeienfaeces	»	»	»	alle +	»	»	»	
Ascites-bouillon	enkele gekarteld	»	»	alle +	»	»	»	
Weefselvochten (na 3 maanden verblijf)	»	lang onbeweeglijk	»	alle +	»	»	»	32110 C o
Id. na agarpassage		»				»		21000 C o
B 9.	*gekarteld*		+	+		*44444 C 4*	*44444 C 4*	*44444 C 4*
Agar	»	»	»	»	»	44443 C 2	32222 C 2	
Koeienfaeces	enkele rond	»	enkele —	»	»	44444 C 2	32222 C 2	
Ascites-bouillon	rond en gekarteld	»	enkele —	»	»	44443 C 3	33333 C 3	
Weefselvochten (na 3 maanden verblijf)	»	lang onbeweeglijk	»	»	»	44443 C 2	22222 C 2	22222 C 2
Id. na agarpassage		»				44443 C 2		22222 C 2
B 10.	*rond*		+	+		*44322 C o*	*21000 C o*	*31000 C o*
Agar	»	»	enkele —	»	»	»	»	
Koeienfaeces	»	»	»	»	»	»	»	
Ascites-bouillon	enkele gekarteld	»	enkele —	»	»	»	»	
Weefselvochten (na 3 maanden verblijf)	»	lang onbeweeglijk	»	»	»	»	»	44300 C o
Id. na agarpassage		»				»		31000 C o

3°. de gasvorming uit koolhydraten kan verdwijnen en weer terugkeeren ;

4°. geen noemenswaardige afwijkingen in agglutinabiliteit.

Hierbij moet ik opmerken, dat de „Klon-umbildungen", die door VAN LOGHEM[35], [36] in zijn stam „Straatsburg" zijn waargenomen, zich bij mijne proeven — waarbij ik uitging van één cel van het type VII van dien stam — in 9 maanden tijds niet herhaald hebben.

Ik mag er aan herinneren, dat VAN LOGHEM bij een anderen stam (SCHUYTENVOERDER), die pas uit het lichaam afgezonderd zich gedroeg als een kloon, op agar een „Klonumbildung" heeft kunnen waarnemen: zijn kweekproeven in NH_4-tartraat-glycerine en bouillon gaven geen nieuwe kloon.

Het eenige, wat ik zag, was een — tijdelijke — toeneming der agglutinabiliteit ten opzichte van typhus-serum.

V. SAMENVATTING.

Bij het vergelijken van de in de vorige hoofdstukken vermelde resultaten onderling en met reeds in de litteratuur bekende feiten kom ik tot de navolgende conclusies:

Variaties op morphologisch gebied worden bij alle hoofdvertegenwoordigers van de typhus-coligroep aangetroffen. Zoowel het uiterlijk der kolonie op de Endoplaat als de vorm en de beweeglijkheid der bacillen kunnen wijzigingen ondergaan. Bij mijne proeven zag ik, dat na 3 maanden verblijf in een levend weefsel de bacteriën lang en onbeweeglijk waren geworden: in dit verband kan ik er op wijzen, dat pas uit het lichaam gekweekte typhusbacillen ook vaak eigen beweging missen. Na één overenting verdween deze afwijking echter aanstonds.

Een duidelijken samenhang van levenswijze en variabiliteit der bacillen heb ik niet kunnen waarnemen; nòch met betrekking tot morphologische nòch tot biochemische eigenschappen.

Dat de veranderlijkheid van B. coli in biochemisch opzicht zoo in het oog loopend groot is, moet wel voor een deel hieraan worden toegeschreven, dat het zoovele koolhydraten en stikstofverbindingen vermag aan te grijpen, meer dan B. paratyphosus en B. typhosus.

Waar vele eigenschappen zijn, kan ook meer variabiliteit bestaan.

Bij nader inzicht blijkt echter aanstonds, dat ook typhus- en paratyphusbacillen schommelingen doen zien in hunne *positieve* biochemische kenmerken.

De door mij waargenomen variaties waren quantitatief en van tijdelijken aard.

Ik heb bij Colibacillen het lactosesplitsend en indolvormend vermogen zien vermeerderen of verminderen, en zelfs tijdelijk zien verdwijnen. Ook de glucose-omzetting bleek niet geheel standvastig.

Dat bij den B. paratyphosus soms de gasvorming uit suiker uitbleef, moet slechts beschouwd worden als eene onderdrukking van een aanwezig vermogen. Immers, dezelfde klonen, die in suiker*peptonwater* „gasloos" waren, produceerden in suiker*bouillon* overvloedig gas.

Wellicht moet op overeenkomstige wijze ook het optreden van ammonium-positieve klonen in typhusbacilculturen worden opgevat.

Levert dus de variabiliteit in morphologische en biochemische kenmerken ons geen voldoende aanknoopingspunten op, om tusschen deze en de levenswijze van den bacil eenigen samenhang aan te nemen, meer uitzicht bieden ons de serologische eigenschappen (VAN LOGHEM).

In dit opzicht zien wij binnen de typhus-coligroep een zeer opmerkelijk verschil.

Terwijl alle gevonden stammen, die door hunne overige eigenschappen als B. typhosus kunnen worden geïdentificeerd, naar hun serologisch gedrag tot één soort gerekend mogen worden en zelden „Klon-umbildungen" of andere serologische verschuivingen vertoonen, vinden wij den toestand bij de paratyphusgroep anders. Van deze treffen wij in de natuur talrijke stammen aan, die door agglutinatiereacties in verscheidene min of meer scherp begrensde soorten kunnen worden gerangschikt. Een enkele maal is gezien, dat de agglutinabiliteit van het „paratyphustype" verschoof naar het „Gärtnertype" en omgekeerd. En dan is het aan VAN LOGHEM[36] gelukt om met de kloonserummethode aan te toonen, dat stammen, die zich oorspronkelijk gedroegen als *klonen* onder omstandigheden, waarvan ons tot dusverre de beteekenis ontgaat, worden tot *populaties*,

doordat daarin klonen optreden, die zoowel serologisch — in agglutinatie en complementbinding — als ook in geringe mate morphologisch en biochemisch afwijkend zijn. Deze „Klonumbildungen" zijn hier veelvuldiger dan bij de typhusbacillen.

Gaan wij nu over tot de coli-achtige organismen, dan vinden wij hier iets, dat alleen opgevat kan worden als een uiterste labiliteit van het receptorenapparaat.

In de natuur vinden wij betrekkelijk zelden twee stammen, die uit serologisch oogpunt volkomen aan elkaar identiek zijn. Sommige zijn in hunne agglutinatiereacties streng specifiek (mijn stammen P I en T II) andere ondergaan den invloed van meer dan één coli-serum (mijn stam K I). „Klonumbildungen" komen herhaaldelijk voor (stam P III en K IV).

Maar bovendien heeft in de meeste stammen na verloop van tijd een vermindering plaats van agglutinabiliteit, terwijl ook onafhankelijk daarvan het complementbindingsvermogen verandert. De serologisch zoo, scherp begrende klonen P I en T II bleven, ten minste in kweekproeven, in dat opzicht echter even standvastig als de typhusbacil. Hierbij mag ik eraan herinneren, dat de faeces der personen P en T, waaruit deze klonen zijn gekweekt en die door mij van tijd tot tijd met behulp van de kloonsera P I en T II zijn onderzocht, in het verloop van weken en maanden coli-stammen opleverden, die steeds minder den invloed dier sera ondergingen. Ik heb dit verschijnsel opgevat als eene verschuiving in het receptoren-apparaat, die bij de kunstmatig voortgekweekte bacillen niet aan den dag trad.

Terloops wil ik nog aanstippen, dat in sommige culturen (evenals in de faeces), als het ware plotseling, klonen werden gezien, die zich kenmerkten door eene agglutinabiliteit door *verscheidene* coli-sera.

Kortom, men kan zich op dit gebied geene variaties voorstellen, of bij den colibacil worden deze aangetroffen.

BORDET en SLEESWIJK[6] zijn bij hunne experimenten met den kinkhoestbacil tot de slotsom gekomen, dat agglutina-

biliteit niet zoo vast aan het wezen der micro-organismen is gebonden als complementbindingsvermogen, en dat dit laatste nog verwantschap aantoont tusschen varianten, die door hunne agglutinatie-reacties hun afkomst reeds verloochenen.

Bij de „Klon-umbildungen" in typhus- en paratyphusculturen is dit niet opgemerkt. Steeds waren door de *beide* biologische reacties de nieuwe klonen different (zie Hoofdstuk IV en VAN LOGHEM[36]). En bij de colibacillen was van eenige regel in het gedrag van agglutinabiliteit en complementbindingsvermogen onderling weinig te bespeuren.

* * *

Het ligt voor de hand, de hierboven geschetste verschillen in samenhang te brengen met andere, die wij binnen de typhus-coligroep aantreffen en wel met het duidelijk onderscheid in levenswijze.

De colibacil, die, rijk toegerust met koolhydraat splitsende fermenten en in staat zich de meest eenvoudige stikstofverbindingen ten nutte te maken, veelal een saprophytisch bestaan leidt, staat in deze opzichten tegenover de typhusbacil: de paratyphusgroep neemt dan een tusschengelegen stelling in.

Zonder te treden in speculatieve beschouwingen omtrent oorzaak en gevolg, zou men zich dien samenhang aldus kunnen voorstellen:

De verhouding tusschen den typhusbacil en een hooger dierlijk organisme — waarvan serologische reacties en pathogeen vermogen de uitingen zijn — zal een standvastig karakter moeten dragen, wil het voortbestaan der soort niet ernstig bedreigd worden. Daarentegen kan die band bij den colibacil losser zijn, zonder dat de *soort* hiervan eenigen hinder ondervindt.

De vraag blijft hier verder open, hoe men zich het tot stand komen — uit phylogenetisch oogpunt — van deze verhouding moet indenken.

Indien men dergelijke beschouwingen tot *theorie* zou willen verheffen, dan zou men toestanden van denzelfden aard als waarop deze berusten, ook moeten aantreffen bij andere groepen van micro-organismen.

Inderdaad is reeds het een en ander in die richting bekend.

KORTHOF[25] zag bij atoxische dysenteriebacillen — die wat hunne levensgewoonten betreft, kunnen worden vergeleken met paratyphus-bacillen — evenzoo „Klonumbildungen"; met andere schrijvers zag hij af van een verdere verdeeling dezer groep in soorten, wegens de labiliteit hunner serologische en biochemische eigenschappen.

GROOT[16] toonde aan, dat van B. proteus vulgaris, die in serologisch gedrag overeenkomt met B. coli, de B. proteus anindologenes kan worden onderscheiden. Door zijne pathogene eigenschappen en zijne agglutinatorische begrensdheid kan hij vergeleken worden met den B. pseudocholerae.

Onderzoekingen van dit gezichtspunt uit zijn zeker ook uit te breiden tot andere groepen van bacteriën. Uit de litteratuur blijkt reeds, dat meningococcus, pneumococcus, streptococcus, B. pseudotuberculosis rodentium — allen organismen dus uit het „grensgebied van commensalisme en parasitisme" — veranderlijkheid vertoonen, die herinneren aan die van het middenlid van de typhus-coligroep, den paratyphus B-bacil.

Zoo voert ons de belangstelling voor de veranderlijkheid van bacteriën tot ver buiten het terrein der bacteriologie, n.l. naar de gebieden van pathologie en epidemiologie.

LITTERATUUR.

1. J. G. ADAMI, Medical contributions to the Study of Evolution. London 1918.
2. BAERTHLEIN, Ueber Mutationserscheinungen bei Bakteriën. Arb. a. d. Kais. Ges. Amte. Bd. 40.
3. ————, Ueber bakterielle Variabilität, insbesondere sogenannte Bakteriën-Mutationen. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 81.
4. BAIL, Veränderungen der Bakteriën im Tierkörper. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 75.
5. BERNHARDT, Ueber Variabilität pathogener Bakteriën. Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 79, 1915.
6. BORDET & SLEESWIJK, Sérodiagnostic et Variabilité des microbes suivant le milieu de culture. Ann. de l'Inst. Pasteur 1910.
7. CLEMESHA, The Bacteriology of surface-waters in the tropics. Calcutta 1912.
8. RUFUS I. COLE, Ueber die Agglutination verschiedener Typhusstämme. Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 58.
9. EISENBERG, Ueber Mutationen bei Bakteriën und anderen Mikroorganismen. Ergebn. d. Immunitätsforschung. Bd. I 1914.
10. ————, Untersuchungen ueber die Variabilität der Bakteriën. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 73 & 80.
11. FLU, De gistingsproef van C. EIJKMAN ter opsporing van faecale verontreiniging van water. Gen. Tijdschrift v. Ned.-Indië. Deel 55.
12. FISCHER, Vorlesungen ueber Bakteriën. 1903.
13. FITZGERALD, Relative frequency of B. coli communior

in contaminated water. Proc. Soc. for exp. Biol. & Med. 1912.

14. GASZNER, Asparagine als Stickstoffquelle für Typhusbakteriën. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 80.
15. GILDEMEISTER, Weitere Mitteilungen ueber Variabilitätserscheinungen bei Bakteriën, etc. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 79.
16. GROOT, Bijdrage tot de rangschikking der zoogenaamde proteusbacillen. Diss. Amsterdam 1917.
17. HENNINGSSON, Eine neue Methode zur Beurteilung der fäkalen Verunreinigung des Wassers, etc. Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 74, 1913.
18. HORROCKS, A comparative study of varieties of B. coli isolated from typhoid and normal dejecta. Journ. of Hyg. 1901.
19. JACKSON, The Classification of the B. coli-group. Journ. of Hyg. 1911.
20. JOHANNSEN, Experimentelle Grundlagen der Deszendenzlehre, Variabilität, Vererbung, Mutation. a. PAUL HINNEBERG. Die Kultur der Gegenwart. III Th., IV Abt.
21. JOST, Vorlesungen ueber Pflanzenphysiologie. 1908.
22. KISCH, Die Verwertbarkeit verschiedener chemischer Verbindungen als Stickstoffnahrung für einige pathogene Bakteriën. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 82.
23. KOLLE U. HETSCH, Die experimentelle Bakteriologie und die Infektionskrankheiten, 1919.
24. KOLLE U. WASSERMANN, Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 2e Auflage.
25. KORTHOF, Proeven over de veranderlijkheid van atoxische dysenteriebacillen. Diss. Amsterdam 1918.
26. KUHN, Fragen der Paragglutination. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 80.
27. LAURENT, Recherches expérimentales sur les maladies des plantes. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1899.
28. LEHMANN, Bakterienmutationen, Allogonie, Klonumbildungen. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 77.

29. LEHMANN, Zur Kenntnis des Paratyphus A. Ibidem, Bd. 79.
30. LEVINE, A Statistical Classification of the colon-cloacae-group. Journ. of Bact., 1918.
31. VON LINGELSHEIM, Zur Frage der Variation der Typhusbacillen und verwandter Gruppen. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 68.
32. VAN LOGHEM, Varietäten des Typhusbazillus und variirende Typhusstämme. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 57.
33. ———, Het grensgebied van commensalisme en parasitisme. Ned. Tijdschrift v. Geneesk., 1917, I No. 13.
34. ———, Ziekte en parasitisme. Amsterdam, 1919.
35. ———, Variabilität und Parasitismus. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 83.
36. ———, Veranderlijkheid van bacteriën, vergeleken binnen de typhus-coligroep. Ned. Tijdschrift v. Geneesk., 1919, II, No. 11.
37. LOTSY, Fortschritte unserer Anschauungen ueber Deszendenz seit Darwin und die jetzige Standpunkt der Frage. Progressus rei Botanicae. Bd. IV, 1911.
38. ———, Die Entstehung der Arten durch Kreuzung und die Ursache der Variabilität. Beitr. z. Pflanzenzucht. H 4, 1914.
39. MAC CONKEY, Lactosefermenting bacteria in faeces. Journ. of Hyg. 1905.
40. ———, Further observations on the differentiation of lactose-fermenting Bacilli with special reference to those of intestinal Origin. Journ. of Hyg. 1909.
41. MAURO JATTA, Experimentelle Untersuchungen ueber die Agglutination des Typhusbazillus und der Mikroorganismen der Coligruppe. Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 33, 1900.
42. MAYMONE, Contributo allo Studio della biologia del Bact. coli Escherich. Bull. de l'Inst. Pasteur. 1918.
43. OETTE, Ein abweichender Paratyphusstamm der Zucker

ohne Gasbildung zersetzt. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 68.

44. OHNO, Paratyphusbazillen ohne Gasbildungsvermogen. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 75.

45. PENFOLD, Studies in bacterial variation. Journ. of Hyg. 1911.

46. ———, On the Specificity of Bacterial Mutation. Ibidem 1912.

47. PRELL, Zur Kenntnis einiger defectiver Coli-formen. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 80.

48. PRINGSHEIM, Die Variabilität niederer Organismen. Berlin, 1910.

49. RADZIEFSKY, Beiträge zur Kenntnis des Bakterium Coli Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 34, 1900.

50. ROSSI & CALENDOLI, Ricerche morfologiche, sistematiche en chimiche sul gruppo del Bact. Coli. Bull. de l'Inst. Pasteur, 1917.

51. ROTHBERGER, Ueber Agglutination des Bakterium Coli. Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 34, 1900.

52. RUSS & TRAWINSKI, Ueber das Vorkommen von Bakteriën der Coli-Typhusgruppe in Pferdemist. Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 85, 1918.

53. SALUS, Zur Paragglutination. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 80.

54. SCHMITZ, Neue Mitteilungen ueber Verwandlungsfähigkeit, etc. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 83.

55. TOENNIESSEN, Ueber Vererbung und Variabilität bei Bakterien, etc. Centr. f. Bakt. I Abt. Orig. Bd. 73 & 75.

56. TOTSUKA, Studien ueber Bact. Coli. Z. f. Hyg. u. Inf. Kr. Bd. 45, 1903.

57. WINSLOW, KLIGLER & ROTHBERG, Studies on the Classification of the colon-typhoid group of Bacteria, etc. Journ. of Bact. 1919.

58. SIDNEY WOLFF, Beiträge zur Lehre der Agglutination, etc. Centr. f. Bakt. Bd. 25.